

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 6 月 30 日 (30.06.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
**WO 2005/058963 A1**

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: **C07K 16/10**, C12N 15/09,  
C12P 21/08, A61K 39/42, G01N 33/563

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/003046

(22) 国際出願日: 2004 年 3 月 9 日 (09.03.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2003-418655  
2003 年 12 月 16 日 (16.12.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団  
法人くまもとテクノ産業財団 (KUMAMOTO TECH-  
NOLOGY AND INDUSTRY FOUNDATION) [JP/JP];  
〒8612202 熊本県上益城郡益城町大字田原 2 0 8 1 番  
地 1 0 Kumamoto (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 阪口 薫雄 (SAK-  
AGUCHI, Nobuo) [JP/JP]; 〒8600085 熊本県熊本市高  
平 1 - 3 0 - 6 9 Kumamoto (JP). 桑原 一彦 (KUWA-  
HARA, Kazuhiko) [JP/JP]; 〒8620971 熊本県熊本市大  
江 4 - 2 - 3 0 Kumamoto (JP). 蓑田 知江美 (MIN-  
ODA, Chiemi) [JP/JP]; 〒8620935 熊本県熊本市御領  
1 丁目 1 1 - 5 5 Kumamoto (JP).

(74) 代理人: 小林 浩, 外 (KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒  
1040028 東京都中央区八重洲二丁目 8 番 7 号 福岡ビ  
ル 9 階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が  
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,  
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が  
可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,  
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG,  
KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY,  
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,  
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

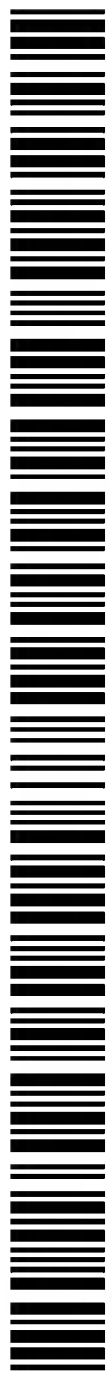
2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ANTI-HIV ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗 H I V 抗体

(57) **Abstract:** It is intended to provide an anti-HIV antibody with high affinity. Namely, an antibody capable of binding to the gp120 glycoprotein of HIV and having a dissociation constant  $KD=1.0 \times 10^{-9}$  (M) or lower, or its fragment; a medicinal composition containing this antibody or its fragment; and a method of producing an anti-HIV antibody or its fragment characterized by comprising immunizing a GANP transgenic nonhuman mammal or its offspring with a polypeptide comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:6 as an antigen and harvesting the antibody from the thus obtained animal or its offspring.

(57) 要約: 本発明の目的は、高親和性抗 HIV 抗体を提供することである。本発明によれば、HIV の gp120 糖タンパク質と結合し、かつ、解離定数が  $KD=1.0 \times 10^{-9}$  (M) 以下の抗体又はその断片、前記抗体又はその断片を含有する医薬組成物、GANP トランスジェニック非ヒト哺乳動物又はその子孫を、配列番号 6 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドを抗原として免疫し、得られる動物又は子孫から抗体を採取することを特徴とする、抗 HIV 抗体又はその断片の製造方法が提供される。



WO 2005/058963 A1

## 明 細 書

## 抗 HIV 抗体

## 技術分野

- 5      本発明は、HIV の外皮膜に存在し分子量約 120kD を有する糖タンパク質 gp120 に高親和性に結合する抗体及びその産生細胞に関する。また、本発明は、上記抗体を含有する医薬組成物に関する。

## 背景技術

- 10      後天性免疫不全症候群(AIDS)は、HIV(Human Immunodeficiency Virus)の感染後、徐々に感染者の免疫能が低下して合併症を起こすようになった状態を意味する。

- HIV は宿主の体内に侵入すると、CD4 陽性細胞、特に CD4<sup>+</sup>T リンパ球（ヘルパー T 細胞）に感染する。CD4 陽性細胞への感染に関与するタンパク質は、HIV  
15      の外被糖タンパク質 gp120 である。gp120 は、HIV の外皮膜に存在し、分子量約 120 キロダルトン（kD）を有する糖タンパク質であり、細胞表面の CD4 を特異的受容体として結合する。そして、HIV は CD4<sup>+</sup>リンパ球に感染後、細胞内に侵入し、脱外被を起こして核酸(RNA)を遊離する。その後、逆転写酵素による DNA  
20      合成、転写、翻訳がなされ、ウイルスタンパク質が合成される。ウイルスタンパク質は細胞膜に移動してウイルス粒子となり放出される。

HIV は抗原変異が激しいため、ワクチンを作製することが困難であり、現在有効なワクチンは開発されていない。また、HIV 遺伝子は感染細胞内の染色体に組み込まれるため、感染した HIV を完全に取り除くという根本的治療は極めて困難である。

- 25      現在、AIDS の発病を遅らせ、延命効果が認められる薬剤として AZT（アジトチミジン）などがあり、有効性が期待できる治療薬も次々と開発されつつある。しかしながら、まだ決定的な治療薬は確立していない。

一方、HIV を効果的に中和する能力を持ち、AIDS の予防や診断に役立つ抗体を得るために種々の試みがなされている。gp120 は HIV の感染にとって最も重要な分子の一つであるため (McDougal et al., Science, 231,382-385 (1986))、HIV の感染の効果的な抑制、感染予防及び診断には、gp120 を標的とすることができる。これまでに、HIV の gp120 の前駆体である gp160 のアミノ酸配列のうち、第 308-331 番目以内にある一つのエピトープを認識する「0.5β」と呼ばれる抗体が作製されている (特許第 2797099 号公報)。しかし、抗原との結合力をさらに高めるには、HIV の gp120 と反応して、効果的にウイルスを中和することができる高親和性抗体を開発することが必要である。

10

## 発明の開示

本発明は、HIV を中和する能力を有する高親和性抗体、及び該抗体を含む医薬組成物を提供することを目的とする。また、後天性免疫不全症候群の治療に用いられる医薬組成物を提供することを目的とする。

15 本発明者は、上記課題を解決するために誠意研究を行った結果、GANP トランスジェニック非ヒト哺乳動物を用いて gp120 により免疫すると、HIV の活性を中和し、かつ HIV と高親和性に結合する抗体を産生することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

20 (1) HIV の gp120 糖タンパク質と結合し、かつ、解離定数が  $KD=1.0 \times 10^{-9}(M)$  以下の抗体又はその断片。

上記抗体又はその断片は、gp120 糖タンパク質のうち第 308-330 番目のアミノ酸配列 (例えば配列番号 6 に示されるもの) の少なくとも一部を認識することができる。

25 本発明の抗体又はその断片は、非ヒト哺乳動物からの血清から採取する抗体、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。

本発明の抗体又はその断片は、例えば受託番号が FERM BP-08644 であるハイ

ブリドーマ細胞〔表示名：「Anti-NL43mono. Clone No.G2-25 ハイブリドーマ細胞」、寄託先：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566））、寄託日：2004年2月25日〕により産生される。

5 (2) 上記抗体又はその断片のV領域を含む、ヒト型化抗体若しくはヒト抗体又はそれらの断片。

(3) 配列番号6に示すアミノ酸配列のうち少なくとも一部を含むポリペプチドを抗原として免疫した GANP トランスジェニック非ヒト哺乳動物又はその子孫から採取される、高親和性抗体産生細胞。

10 また本発明は、受託番号が FERM BP-08644 である、HIV の gp120 糖タンパク質に対するモノクローナル抗体産生細胞を提供する。

(4) GANP トランスジェニック非ヒト動物又はその子孫を、配列番号6に示すアミノ酸配列のうち少なくとも一部を含むポリペプチドを抗原として免疫し、得られる動物又は子孫から抗体を採取することを特徴とする、抗 HIV 抗体又はその断片の製造方法。

15 (5) 上記(3)記載の高親和性抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合細胞、又は受託番号が FERM BP-08644 で表されるモノクローナル抗体産生細胞を培養し、得られる培養物から抗体を採取することを特徴とする、抗 HIV 抗体又はその断片の製造方法。

20 (6) 上記(1)記載の抗体又はその断片、及び上記(2)記載のヒト型化抗体若しくはヒト抗体又はそれらの断片からなる群から選択される少なくとも1つを含有する医薬組成物。

本発明の医薬組成物は、後天性免疫不全症候群の治療薬として使用することが可能である。

25 (7) 上記(1)記載の抗体若しくはその断片、又は上記(2)記載のヒト型化抗体若しくはヒト抗体若しくはそれらの断片と、HIV の gp120 糖タンパク質とを反応させることを特徴とする HIV の検出方法。



(8) 上記(1)記載の抗体又はその断片、及び上記(2)記載のヒト型化抗体若しくはヒト抗体又はそれらの断片からなる群から選択される少なくとも1つを含有するHIV検出用キット。

## 5 図面の簡単な説明

図1は、B細胞におけるGANPの発現の増加を示す図である。

図2は、ELISAを用いて各抗体によるgp120(308-330)ペプチドを検出した結果を示す図である。

図3は、各クローンの解離定数を測定した結果を示す図である。

10 図4は、各抗HIVモノクローナル抗体のエンベロープに対する結合能を評価した結果を示す図である。

図5は、各抗HIVモノクローナル抗体のエンベロープに対する結合能を評価した結果を示す図である。

図6は、各抗HIVモノクローナル抗体の中和活性試験結果を示す図である。

15 図7は、各抗HIVモノクローナル抗体の中和活性試験結果を示す図である。

## 発明を実施するための最良の形態

### 1. 概要

本発明の抗体は、GANP トランスジェニック哺乳動物に、HIV の gp120 の一部、特に gp120 のアミノ酸配列のうち第 308-330 のアミノ酸配列からなるペプチドを抗原として免疫することにより得られたものである。gp120 のアミノ酸配列のうち第 308-330 番目の配列(「gp120(308-330)」という)を認識する抗体は、ウイルス中和活性、及び感染細胞による合胞体形成抑制活性を有することが知られているが(Skinner MA. et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses (1988), 4(3), 187-197)、本発明の抗体は、gp120(308-330)と高親和性に結合することを特徴とするものである。

ここで、GANP とは、胚中心結合核タンパク質(Germinal center-associated

nuclear protein)と呼ばれている核タンパク質である。GANP は、遺伝子に変異を誘導するプロセスにおいて直接的及び間接的に必要な分子である。また、GANP は、遺伝子変異を修復する際に、高親和性の抗体が得られるように V 領域の変異の誘導を促す能力を保有していることから、GANP をコードする遺伝子を導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物（「GANP トランスジェニック非ヒト哺乳動物」という）は、この GANP 遺伝子の導入によって、獲得性免疫の高親和性抗体産生を促進することができる。また、この GANP トランスジェニック非ヒト哺乳動物は、速やかに抗原に対する結合力の高い抗体を産生することができる。従って、上記トランスジェニック非ヒト哺乳動物を、HIV の gp120 のアミノ酸配列のペプチド（例えば gp120(308-330)）を抗原に用いて免疫することで、従来は得られないような高親和性の抗体を簡便に得ることができる。

上述の通り、本発明により、HIV 中和活性、感染細胞の合胞体形成抑制作用を有し、従来は得られないような高親和性の抗 HIV 抗体を得ることができる。そして、得られた抗体を含む医薬組成物は、AIDS の治療に用いることができる。

上記抗体を産生する細胞は、gp120 で免疫した GANP トランスジェニック非ヒト哺乳動物から得られた脾臓 B 細胞又はリンパ節細胞単独でもよく、B 細胞又はリンパ細胞とミエローマ細胞とを融合させたハイブリドーマ細胞でもよい。本発明は、上記抗体を産生する細胞についても提供する。

さらに、HIV 感染を確認する臨床検査においては、HIV を高感度に検出することが重要である。その検出手段として、本発明の高親和性抗 HIV 抗体を用いることができる。従って、本発明は、抗 HIV 抗体を含む HIV 検出キットを提供するものである。

## 2. 抗原の調製

HIV の gp120 はデータベース等から配列情報を得ることが可能であり(PRF 1102247A, [http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www\\_bget?prf:1102247A](http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www_bget?prf:1102247A))、そのアミノ酸配列は配列番号 5 に示されるものである。

そして、gp120(308-330)のポリペプチド配列は、

NNTRKSIRIQRGPGRAFVTIGKI (配列番号 6)

で表される 23 アミノ酸残基であり(Lee Ratner et al., Nature 313, 277-284, 1985)、このアミノ酸配列のうちの少なくとも一部（全部又は一部）を含むポリ  
5 ペプチド又はペプチド（単にペプチドともいう）抗原として使用することができる。

ここで、抗原に用いる上記配列番号 6 で示されるペプチド配列の「アミノ酸配  
列の少なくとも一部」とは、長さに特に限定されるものではない。例えば 23 ア  
ミノ酸残基のうち連続する 8 アミノ酸残基以上、例えば 8、10、12、16、20、23  
10 アミノ酸残基が挙げられる。また、選択する場所は、配列番号 6 の中の連続した  
アミノ酸であれば特に限定されず、任意の場所を選択することができる。例えば、  
7～8 アミノ酸残基を抗原に用いる場合には、配列番号 6 で示される 23 残基のア  
ミノ酸配列を、N末端から順に 7～8 アミノ酸ずつ 3つの領域に渡ってアミノ酸  
配列を選択してもよく、N末端から 1 アミノ酸ずつ C末端側にずらした領域の配  
15 列を選択してもよい。

抗原には、配列番号 6 及び上記のアミノ酸配列の少なくとも一部を、単独又は  
混合して用いることができる。

また、上記ペプチドをキャリアタンパク質と結合させ、該ペプチドを側鎖とし  
て多数持つように抗原を作製してもよい。この場合は、上記ペプチドの N 末端に、  
20 キャリアタンパク質を結合させるためのシステイン残基を付加することができる。

ペプチドの作製方法は、化学合成でも、大腸菌などを用いる生化学的合成でも  
よく、これらは当業者に周知の方法を用いることができる。

本発明のペプチドの化学合成を行う場合は、ペプチドの合成の周知方法によっ  
て合成することができる。例えば、アジド法、酸クロライド法、酸無水物法、混  
25 合酸無水物法、DCC 法、活性エステル法、カルボイミダゾール法、酸化還元法  
等が挙げられる。また、その合成は、固相合成法及び液相合成法のいずれをも適  
用することができる。市販のペプチド合成装置（島津製作所製 PSSM-8 など）を

使用してもよい。

反応後は、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などの通常の精製法を組み合わせることで本発明のペプチドを精製することができる。

- 5      本発明のペプチドの生化学的合成を行う場合は、まず、該ペプチドをコードする DNA を設計し合成する。そして、上記 DNA を適当なベクターに連結することによってタンパク質発現用組換えベクターを得、該組換えベクターを目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することによって形質転換体を得ることができる (Sambrook J and Russel D. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd  
10 edition, CSHL Press, 2001)。

ベクターには、宿主微生物で自律的に増殖し得るファージ又はプラスミドが使用される。プラスミド DNA としては、大腸菌、枯草菌又は酵母由来のプラスミドなどが挙げられ、ファージ DNA としてはλファージが挙げられる。さらに、動物ウイルス、昆虫ウイルスベクターを用いることもできる。

- 15      組換えベクターの作製は、精製された DNA を適当な制限酵素で切断し、適当なベクター DNA の制限酵素部位等に挿入してベクターに連結すればよい。

- 形質転換に使用する宿主としては、目的の遺伝子を発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、細菌（大腸菌、枯草菌等）、酵母、動物細胞（COS 細胞、CHO 細胞等）、昆虫細胞又は昆虫が挙げられる。ヤギ等の哺乳  
20 動物を宿主として使用することも可能である。

宿主への組換えベクターの導入方法は公知であり、任意の方法（例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等）が挙げられる。

- 本発明において、本発明のペプチドは、前記形質転換体を培養し、その培養物  
25 から採取することにより得ることができる。「培養物」とは、(a)培養上清、(b)培養細胞若しくは培養菌体又はその破砕物のいずれをも意味するものである。

培養法は、当分野において周知である（前記 Sambrook ら、Molecular Cloning



を参照)。

培養後、目的ペプチドが菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破碎することによりペプチドを抽出する。また、目的ペプチドが菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により

5 菌体又は細胞を除去する。その後、ペプチドの単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせて用いることにより、目的のペプチドを単離精製することができる。

本発明においては、*in vitro* 翻訳によるペプチド合成を採用することもできる。

10 この場合は、RNA を鋳型にする方法と DNA を鋳型にする方法（転写／翻訳）の2通りの方法を用いることができる。例えば、鋳型 DNA としては、翻訳開始点の上流にプロモーターとリボゾーム結合部位を有している該ペプチドをコードする DNA、あるいは翻訳開始点の上流に転写に必要なプロモーター等が組み込まれた DNA が挙げられる。*in vitro* 翻訳システムは、市販のシステム、例えば

15 Expressway™ システム (Invitrogen 社)、PURESYSTEM (登録商標；ポストゲノム研究所)、TNT システム(登録商標；Promega 社)などを用いることができる。*in vitro* 翻訳システムによるペプチド合成後は、上記の一般的な生化学的方法を単独又は組み合わせることにより、目的のペプチドを単離精製することができる。

20 上記のように得られたペプチドに結合させるキャリアタンパク質としては、牛血清アルブミン(BSA)、keyhole limpet hemocyanin(KLH)、human thyroglobulin、ニワトリガンマグロブリンを挙げることができる。

### 3. GANP

25 GANP は、酵母 Sac3 タンパク質とホモロジーを有する 210kD の核タンパク質である (WO00/50611 号公報)。そして、SAC3 はアクチン形成の抑制物質として特徴づけられている。また、GANP は、濾胞樹状細胞(follicular dendritic cells:

FDC)により囲まれる胚中心(germinal center, GC)B 細胞において選択的にアップレギュレートされ、リン酸化依存性 RNA プライマーゼ活性を有し、B 細胞の細胞周期調節に関与しているタンパク質である (Kuwahara, K. et al., (2000) Blood 95, 2321-2328)。

- 5 本発明においては、GANP タンパク質のアミノ酸配列を、マウスについて配列番号 2 に、ヒトについて配列番号 4 に示す。また、GANP タンパク質をコードする遺伝子 (GANP 遺伝子という) の塩基配列を、マウスについて配列番号 1 に、ヒトについて配列番号 3 に示す。なお、上記アミノ酸配列及び塩基配列は、国際公開 WO00/50611 号公報にも記載されている。
- 10 また GANP タンパク質は変異体でもよく、配列番号 2 又は 4 に記載のアミノ酸配列において 1 又は複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列であって RNA プライマーゼ活性を有するタンパク質であってもよい。例えば、配列番号 2 又は 4 に示すアミノ酸配列のうち 1 若しくは複数個 (好ましくは 1 個又は数個 (例えば 1 個～10 個、さらに好ましくは 1 個～5 個)) のアミノ酸が欠
- 15 失しており、1 若しくは複数個 (好ましくは 1 個又は数個 (例えば 1 個～10 個、さらに好ましくは 1 個～5 個)) のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されており、及び／又は 1 若しくは複数個 (好ましくは 1 個又は数個 (例えば 1 個～10 個、さらに好ましくは 1 個～5 個)) の他のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、かつ上記 GANP タンパク質と同様の RNA プライマーゼ活性を有する
- 20 GANP 変異型タンパク質を使用することもできる。

「RNA プライマーゼ活性」とは、RNA 複製において、5'→3'方向に進む鎖の伸長とは逆向きの鎖 (ラギング鎖) を合成する際に、伸長の開始点となる短いプライマーの RNA を合成する酵素活性を意味する。通常は  $\alpha$  プライマーゼと呼ばれる DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  と結合する分子が用いられるが、胚中心 B 細胞では第二

25 のプライマーゼである GANP プライマーゼも誘導されている。

GANP タンパク質は、上記配列番号 2 若しくは 4 に示すアミノ酸配列又はこれらの変異型アミノ酸配列のほか、N 末端側の一部の配列 (例えば配列番号 2 に示

すアミノ酸配列の 1~600 番、好ましくは 139~566 番) 又はこれらの変異型アミノ酸配列を有するものも含まれる。

本発明において、動物に導入するための GANP 遺伝子は、上記 GANP タンパク質、N 末側の一部の配列、又は変異型タンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。そのような遺伝子として、例えば配列番号 1 又は 3 に示す塩基配列を有するものを使用することができる。配列番号 1 又は 3 に示す塩基配列のうち、コード領域のみの塩基配列であってもよい。また、上記配列番号 1 又は 3 に示す塩基配列に相補的な配列と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、RNA プライマーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を使用することも可能である。

「ストリンジェントな条件」とは、ハイブリダイズさせた後の洗浄時の条件であって塩(ナトリウム)濃度が 150~900mM であり、温度が 55~75℃、好ましくは塩(ナトリウム)濃度が 250~450 mM であり、温度が 68℃での条件をいう。

遺伝子に変異を導入するには、Kunkel 法や Gapped duplex 法等の公知手法により、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット、例えば GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System (インビトロジェン社製)、TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System (Mutan-K、Mutan-Super Express Km 等: タカラバイオ社製) を用いて行うことができる。

変異遺伝子の詳細並びに取得方法は国際公開 WO00/50611 号公報にも記載されている。

なお、抗  $\mu$  抗体及び抗 CD-40 モノクローナル抗体で B 細胞を in vitro 刺激すると、GANP 発現のアップレギュレーションのみならず、GANP タンパク質のアミノ酸配列のうち特定のセリン残基(例えば 502 番目のセリン: S502)のリン酸化を引き起こす。この反応は、GANP の RNA プライマーゼ活性についてキーとなる反応である(Kuwahara, K. et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 10279-10283)。GANP タンパク質の N 末端側の RNA プライマーゼドメインはセリン残基を含んでおり、そのリン酸化は in vitro において Cdk2 によって触媒さ

れる。C 末端側ドメインにより、GANP は MCM3 複製ライセンス因子に結合する(Kuwahara, K. et al., (2000) Blood 95, 2321-2328; Abe, E. et al. (2000) Gene 255, 219-227)。

5 なお、GANP 遺伝子欠損マウスは胎生致死であるが、CD19-Cre マウスと flox-ganp 遺伝子のマウスを交配して作製した B 細胞に選択的に GANP 遺伝子を欠損した conditional targeting マウスを作製して、T 細胞依存性抗原である nitrophenyl (NP)-ニワトリガンマグロブリン抗原で免疫して NP-ハプテン特異的な抗体産生を調べたところ、高親和性抗体産生が著しく障害されており、GANP 分子が抗体の親和性亢進に重要な機能をしていることが明らかになった。

10

#### 4. GANP 遺伝子を導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物

gp120 による免疫の対象となる動物は、GANP 遺伝子を導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物であり、当該トランスジェニック非ヒト哺乳動物は、好ましくは、導入した GANP 遺伝子を B 細胞で発現することができる。

#### 15 (1) GANP 遺伝子とその関連分子

GANP 遺伝子とその関連分子で形成される複合体は、遺伝子に変異を誘導するプロセスで直接および間接的に必要な分子である。GANP タンパク質は、遺伝子変異を修復する際に、高親和性の抗体が得られるように V 領域の変異の誘導を促す能力を保有していることから、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、  
20 この GANP 遺伝子又はその変異遺伝子の導入によって、獲得性免疫の高親和性抗体産生を促進することができる。また、この遺伝子を過剰に発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、速やかに抗原に対する結合力の高い抗体を産生することができる。従って、上記トランスジェニック非ヒト哺乳動物を所定の抗原で免疫することで、従来では得られないような高親和性の抗体を簡便に得ることができる。その結果、難治性の病原微生物や異物を排除できるポリクローナル抗体  
25 又はモノクローナル抗体を得ることができる。また、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物を用いてヒト型化抗体を作製することによって、あるいは、本



発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物が産生する抗体のV領域を含む一本鎖抗体を作製することによって、抗体療法の効力を飛躍的に高めることが可能となる。

5 本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、GANP 又はその変異遺伝子の導入によって、B 細胞で高親和性抗体の産生を促進することができ、前記高親和性抗体産生細胞はアポトーシスを誘導するシグナルに対して抵抗性を有する。

## (2) GANP 遺伝子導入用哺乳動物

10 本発明における「哺乳動物」とは、ウシ、ウマ、ブタ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ハムスター及びモルモット等の任意の非ヒト哺乳動物を意味し、好ましくはマウス、ウサギ、ラットまたはハムスターであり、特に好ましくはマウスである。

15 本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）の細胞に対して、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより、GANP 遺伝子を導入することにより作製

20 することができる。また、上記遺伝子導入方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする GANP 遺伝子を転移させ、細胞培養、組織培養などに利用することもできる。さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と公知の細胞融合法により融合させることにより、トランスジェニック非ヒト哺乳動物を作製することもできる。

25 GANP 遺伝子を対象動物に導入させる際、当該遺伝子を対象となる動物の細胞で発現させうるプロモーターの下流に連結した遺伝子構築物として導入することが好ましい。具体的には、目的とする GANP 遺伝子を有する各種哺乳動物由来の GANP 遺伝子を発現させうる各種プロモーターの下流に、GANP 遺伝子を連結し

たベクターを、対象となる哺乳動物の受精卵（例えば、マウス受精卵）にマイクロインジェクションすることによって、目的とする GANP 遺伝子を高発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物を作製することができる。

### 5 (3) 発現ベクター

GANP 遺伝子の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 $\lambda$  ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルス又はバキュロウイルスなどの動物又は昆虫ウイルスなどが用いられる。

- 10 遺伝子発現の調節を行うプロモーターとしては、たとえばウイルス由来遺伝子のプロモーター、各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）および鳥類（ニワトリなど）由来遺伝子のプロモーターなどを使用することが可能である。

- 15 ウイルス由来遺伝子のプロモーターとしては、例えばサイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JC ウイルス、乳癌ウイルス等由来遺伝子のプロモーターが挙げられる。

- 各種哺乳動物及び鳥類由来遺伝子のプロモーターとしては、例えば、アルブミン、インスリン II、エリスロポエチン、エンドセリン、オステオカルシン、筋クレアチンキナーゼ、血小板由来成長因子  $\beta$ 、ケラチン K1, K10 および K14、コラーゲン I 型および II 型、心房ナトリウム利尿性因子、ドーパミン  $\beta$ -水酸化酵素、  
20 内皮レセプターチロシンキナーゼ、ナトリウムカリウムアデノシン 3 リン酸化酵素、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネイン I 及び IIA、メタロプロティナーゼ 1 組織インヒビター、MHC クラス I 抗原、平滑筋  $\alpha$  アクチン、ポリペプチド鎖延長因子 1  $\alpha$  (EF-1  $\alpha$ )、 $\beta$  アクチン、 $\alpha$  及び  $\beta$  ミオシン重鎖、ミオシン  
25 軽鎖 1 及び 2、ミエリン基礎タンパク、血清アミロイド P コンポーネント、ミオグロビン、レニンなどの遺伝子のプロモーターが挙げられる。

上記ベクターは、トランスジェニック非ヒト哺乳動物において目的とするメッ

センジャーRNA の転写を終結するターミネターを有していてもよい。その他、GANP 遺伝子をさらに高発現させる目的で、各遺伝子のスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核生物遺伝子のイントロンの一部をプロモーター領域の 5' 上流、プロモーター領域と翻訳領域間、あるいは翻訳領域の 3' 下流 に連結すること  
5 ことも所望により可能である。

本発明の好ましい態様では、免疫グロブリンプロモーターの下流に GANP 遺伝子を連結することにより、あるいはヒト免疫グロブリン遺伝子イントロンエンハンサー部分を GANP 遺伝子の 5' 側に連結することにより、GANP 遺伝子を B 細胞で選択的に発現させることができる。

10

#### (4) GANP 遺伝子の導入

受精卵細胞段階における GANP 遺伝子の導入は、例えば対象の哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保することが好ましい。遺伝子導入後の作出動物の胚芽細胞において GANP 遺伝子が過剰に存在することは、  
15 作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに GANP 遺伝子を過剰に有することを意味する。そして、遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに GANP 蛋白質を過剰に有する。

本発明においては、導入遺伝子を相同染色体の一方に持つヘテロ接合体を取得し、ヘテロ接合体同士を交配することで導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモ接合体を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が導入された GANP 遺伝子を安定に保持する。そして、GANP 遺伝子を過剰に有することを確認して、通常の飼育環境で繁殖継代することができる。

トランスジェニック対象動物が有する内在性の遺伝子とは異なる遺伝子である外来性 GANP 遺伝子を対象非ヒト哺乳動物（好ましくはマウスなど）、又はその先祖の受精卵（バッククロス）に転移する際に用いられる受精卵は、同種の雄哺乳動物と雌哺乳動物を交配させることによって得られる。  
25

受精卵は自然交配によっても得られるが、雌哺乳動物の性周期を人工的に調節

した後、雄哺乳動物と交配させる方法が好ましい。雌哺乳動物の性周期を人工的に調節する方法としては、例えば、初めに卵胞刺激ホルモン（妊馬血清性腺刺激ホルモン(PMSG)）、次いで黄体形成ホルモン（ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)）を、例えば腹腔注射などにより投与する方法が好ましい。

- 5 得られた受精卵に、前述の方法により外来性 GANP 遺伝子を導入した後、雌哺乳動物に人工的に移植・着床することにより、外来性遺伝子を組み込んだ DNA を有する非ヒト哺乳動物が得られる。雌哺乳動物に黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)を投与後、雄哺乳動物と交配させることにより受精能を誘起された偽妊娠雌哺乳動物に、受精卵を人工的に移植・着床させる方法が好ましい。遺伝子
- 10 を導入する全能性細胞としては、マウスの場合、受精卵や初期胚を用いることができる。また培養細胞への遺伝子導入法としては、トランスジェニック非ヒト哺乳動物個体の産出効率や次代への導入遺伝子の伝達効率を考慮した場合、DNA のマイクロインジェクションが好ましい。

- 遺伝子を注入した受精卵は、次に仮親の卵管に移植され、個体まで発生し出生
- 15 した動物を里親につけて飼育させたのち、体の一部（マウスの場合には、例えば、尾部先端）から DNA を抽出し、サザン解析や PCR 法により導入遺伝子の存在を確認することができる。導入遺伝子の存在が確認された個体を初代（Founder）とすれば、導入遺伝子はその子(F1)の 50%に伝達される。さらに、この F1 個体を野生型動物または他の F1 動物と交配させることにより、2 倍体染色体の片方
- 20 （ヘテロ接合）または両方（ホモ接合）に導入遺伝子を有する個体(F2)を作製することができる。

- あるいは、GANP 蛋白質高発現トランスジェニック非ヒト哺乳動物は、上記した GANP 遺伝子を ES 細胞（embryonic stem cell）に導入することによって作製することもできる。例えば、正常マウス胚盤胞（blastocyst）に由来する HPRT
- 25 陰性（ヒポキサンチン・グアニン・フォスフォリボシルトランスフェラーゼ遺伝子を欠いている）ES 細胞に、GANP 遺伝子を導入する。当該 GANP 遺伝子がマウス内在性遺伝子上に相同組み換えを起こさせ、インテグレートされた ES 細胞を



HAT セレクション法により選別する。次いで、選別した ES 細胞を、別の正常マウスから取得した受精卵（胚盤胞）にマイクロインジェクションする。得られた胚盤胞を、仮親としての別の正常マウスの子宮に移植する。その後、仮親マウスからキメラトランスジェニックマウスが生まれる。生まれたキメラトランスジェニックマウスを正常マウスと交配させることにより、ヘテロトランスジェニックマウスを得ることができる。そして、ヘテロトランスジェニックマウス同士を交配することにより、ホモトランスジェニックマウスが得られる。

本発明においては、上記したトランスジェニック非ヒト哺乳動物に限らず、その子孫、並びにトランスジェニック非ヒト哺乳動物又はその子孫の一部も本発明の範囲内である。トランスジェニック非ヒト哺乳動物の一部としては、当該トランスジェニック非ヒト哺乳動物又はその子孫の組織、器官及び細胞などが挙げられ、器官または組織としては、脾臓、胸腺、リンパ節、骨髄あるいは扁桃腺などが挙げられ、細胞としては B 細胞などが挙げられる。

本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、B 細胞をさらに活性化する哺乳動物と交配することも可能であり、これによりさらに高親和性抗体を産生することが可能である。

最近、MRL/lpr マウスで B 細胞が末梢のリンパ節での活性化の際に胚中心を経過した後、T 細胞領域でさらに V 領域の突然変異誘導が亢進していることが報告されている。また、本発明者らも MRL/lpr マウスにおいて GANP 遺伝子が Ig プロモーター、エンハンサーの下流に結合して作製した ganp トランスジェニックマウスに見られるのと同等の高い発現が、非免疫の状態で見られることを見出している。このことは、正常では自己の抗原に対しては高親和性の抗体はできないのに対して、この自己免疫疾患マウスでは、GANP 分子の異常な活性化が起こるために、自己の抗原に対しての高親和性抗体が産生されることとなる可能性が示唆される。

そこで、上記 B 細胞をさらに活性化する動物として、自己免疫疾患マウスであるとされる MRL/lpr, NZB, (NZB x NZW)F1 などを用いれば、さらに高い変異誘

導を期待できる。

以上のことを利用した MLR/lpr マウスの GANP トランスジェニックマウスを作製することによって、スーパー高親和性抗体産生マウスを作出できる可能性がある。すなわち、本発明の GANP 遺伝子過剰発現トランスジェニック非ヒト哺乳動物とさまざまな自己免疫疾患モデル動物との交配により、高親和性抗体を産生  
5 できる哺乳動物を作製することができる。

## 5. HIV gp120 に対する高親和性抗体の作製

### (1) 高親和性抗体

- 10 本発明において「抗体」とは、抗原である gp120 のアミノ酸配列第 308-330 番目のペプチドに結合し得る抗体分子全体（ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であっても良い）またはその断片を意味する。また、本発明の抗体のアイソタイプは特に限定されず、例えば、IgG(IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>)、IgM、IgA(IgA<sub>1</sub>、IgA<sub>2</sub>)、IgD 又は IgE である。
- 15 本発明では、抗原に対する反応性が高い抗体のことを高親和性抗体という。「高親和性」とは、抗体が抗原と結合する結合能が高いことを意味し、抗体の結合能が一般のマウスなどの動物を用いて作製した抗体と比較して高く、また逆に当該抗原から解離することが遅い抗体のことをいう。これはエピトープに対して、立体的に密接して結合する能力が高く特異的であることを意味すると共に、抗体が  
20 結合することによってエピトープのみならずその抗原の構造の変換をきたすことによって結果的に強力な活性、例えば毒素中和活性、HIV の感染性阻止、不活性化などの生物活性を示すことも包含している。

抗体の結合能（親和性）は、スキッチャード解析や Biacore と呼ばれる表面プラズモン共鳴センサーにより、解離定数(KD)、解離速度定数(K<sub>diss</sub>)、結合速度  
25 定数(K<sub>ass</sub>)として測定することができる。Biacore 装置は、センサーチップ、マイクロ流路系、SPR 検出系の 3 つの技術を統合して分子結合の強さ、速さ、選択性を測定するというものであり、標識を使わずにリアルタイムで生体分子の検出

と複数個の分子間での相互作用のモニタリングを行うことができる。Biacore 装置としては、例えば Biacore 3000、Biacore 2000、Biacore X、Biacore J、Biacore Q（いずれも Biacore 社）などが挙げられる。

上記 Biacore によって、抗体の親和性を示すパラメーター、すなわち解離定数 (KD)、解離速度定数(Kdiss) [1/Sec] 及び結合速度定数(Kass) [1/M.Sec]を測定する。

抗体は、解離定数 (KD 値) が小さい値であるほど親和性が高いという点で好ましい。抗体の結合能 (親和性) は、Kdiss 及び Kass の 2 つのパラメーターにより決定され、

$$10 \quad KD[M] = Kdiss/Kass$$

により表わされる。

抗原の種類等複数の要因によって、得られる抗体の親和性は異なるが、KD 値は  $1 \times 10^{-9}(M)$ 以下であることが好ましく、 $1.5 \times 10^{-10}(M)$  以下であることがより好ましく、 $1.0 \times 10^{-10}(M)$ 以下（特に  $9.9 \times 10^{-11}(M)$ 以下）であることがさらに好ましい。

本発明においては、作製された抗体が上記いずれかの作用又は性質を発揮する抗体であるときに、高親和性であると判断される。

本発明の抗体（ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体及び活性フラグメント）は、種々の方法のいずれかによって製造することができる。このような抗体の製造法は当該分野で周知である。

## (2) ポリクローナル抗体の作製

上記の通り作製した抗原を GANP トランスジェニック非ヒト哺乳動物に投与する。哺乳動物は特に限定されものではなく、例えばラット、マウス、ウサギなどを挙げることができるが、GANP トランスジェニックマウス、又は GANP トランスジェニックウサギが好ましい。

抗原の動物一匹あたりの投与量は、アジュバントを用いないときは、5 ～ 50

- mg であり、アジュバントを用いるときは 0.5 ~ 2 mg である。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント(FIA)、水酸化アルミニウムアジュバント、トレハロースダイマイコレート(TDM)、リポ多糖(LPS)、シリカアジュバント、市販の免疫賦活薬等が挙げられる。免疫は、主として静脈内、皮下、腹腔内等に注入することにより行われる。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは 1~5 週間間隔で、1~10 回、好ましくは 2~3 回免疫を行う。そして、最終の免疫日から 6~60 日後に酵素免疫測定法(ELISA[enzyme-linked immunosorbent assay]又はEIA[enzyme immunoassay])、放射性免疫測定法(RIA[radioimmuno assay])等で抗体価を測定し、所望の抗体価を示した日に採血し、抗血清を得る。上記抗体の採取方法において、抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製することができる。
- その後は、抗血清中のポリクローナル抗体の反応性を ELISA 法などで測定する。

### (3) モノクローナル抗体の作製

#### (a) 抗体産生細胞の採取

- 前記のように作製した抗原を、GANP トランスジェニック非ヒト哺乳動物、例えばラット、マウス、ウサギなどに投与する。抗原の動物一匹あたりの投与量はアジュバントを用いないときは、0.05~2mg であり、アジュバントを用いるときは 0.05~2mg である。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント(FIA)、水酸化アルミニウムアジュバント、BCG、トレハロースダイマイコレート(TDM)、リポ多糖(LPS)、シリカアジュバント等が挙げられるが、抗体の誘導能等の関係から、FCA と FIA とを組み合わせ使用することが好ましい。免疫は、主として静脈内、皮下、腹腔内に注入すること



により行われる。また、免疫動物は、抗原の初回免疫後、さらに、追加免疫を数回行い、適当な日数を経過した後に部分採血を行い、上記方法で抗体価を測定することが好ましい。本発明の方法で産生される抗体は高親和性抗体であるため、上記免疫は初回のみで十分である可能性がある。免疫の間隔は特に限定されず、

5 数日から数週間間隔、好ましくは 2～5 週間間隔で、1～10 回、好ましくは 1～5 回免疫を行う。そして、最終の免疫日から 1～60 日後、好ましくは 1～14 日後に抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血細胞などが挙げられるが、脾臓細胞、又は局所リンパ節細胞が好ましい。

上記のようにして得られる本発明の高親和性抗体産生細胞も本発明に含まれる。

## 10 (b) 細胞融合

例えば、GANP トランスジェニックマウスを用いた場合、ハイブリドーマを得るため、抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行う。抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞として、マウスなどの動物の一般に入手可能な株化細胞を使用することができる。使用する細胞株としては、薬剤選択性を有し、未融合

15 の状態では HAT 選択培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを含む）で生存できず、抗体産生細胞と融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが好ましい。ミエローマ細胞としては、例えば、P3-X63.Ag8(X63)、P3-X63.Ag8.U1(P3U1)、P3/NS I/1-Ag4-1(NS1)、Sp2/0-Ag14(Sp2/0)等のマウスミエローマ細胞株を挙げることもできる。ミエローマ細胞の選択に当たっては、

20 抗体産生細胞との適合性を適宜考慮する。

次に、上記ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを細胞融合させる。細胞融合は、血清を含まない DMEM、RPMI-1640 培地などの動物細胞用培地中で、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  個/ml の抗体産生細胞と  $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$  個/ml のミエローマ細胞とを混合し（抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞比 5 : 1 が好ましい）、細胞融

25 合促進剤存在の下で融合反応を行う。細胞融合促進剤として、平均分子量 1000～6000 ダルトン(D)のポリエチレングリコールなどを使用することができる。また、電気刺激（例えばエレクトロポレーション）を利用した市販の細胞融合装置

を用いて、抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることもできる。

(c) ハイブリドーマの選別及びクローニング

細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する。その方法として、細胞懸濁液を例えばウシ胎児血清含有 RPMI-1640 培地などに適当に希釈  
5 後、マイクロタイタープレート上にまき、各ウェルに選択培地を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。その結果、選択培地で培養開始後、14 日前後から生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

次に、増殖してきたハイブリドーマの培養上清中に、gp120 に反応する抗体が存在するか否かをスクリーニングする。ハイブリドーマのスクリーニングは、通常の方法に従えばよく、特に限定されるものではない。例えば、ハイブリドーマ  
10 として生育したウェルに含まれる培養上清の一部を採集し、ELISA、EIA、RIA などによってスクリーニングすることができる。

融合細胞のクローニングは、限界希釈法等により行う。gp120 に強い反応性を示す抗体であって、親和性を示す値が  $KD = 1 \times 10^{-9}$  (M) 以下である抗体を産生するハイブリドーマを選択し、樹立する。  
15

(d) モノクローナル抗体の採取

樹立したハイブリドーマを培養し、得られる培養物からモノクローナル抗体を採取する方法として、通常の細胞培養法、又は腹水形成法等を採用することができる。「培養」とは、上記ハイブリドーマをシャーレやディッシュで生育すること、または上記ハイブリドーマを下記のように腹腔内で増殖することを意味する。  
20 また、「培養物」とは、培養上清、培養細胞若しくはその破碎物、又は腹水のいずれをも意味するものである。

細胞培養法においては、ハイブリドーマを 10%ウシ胎児血清含有 RPMI-1640 培地、MEM 培地又は無血清培地等の動物細胞培養培地中で、通常の培養条件（例えば 37℃、5%CO<sub>2</sub> 濃度）で 7~14 日間培養し、その培養上清から抗体を取得する。  
25

腹水形成法の場合は、ミエローマ細胞由来の哺乳動物と同種系動物の腹腔内に

ハイブリドーマを約  $1 \times 10^7$  個投与し、ハイブリドーマを大量に増殖させる。そして、1～2週間後に腹水を採集する。

上記抗体の採取方法において、抗体の精製が必要とされる場合は、硫安塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィー  
5 等の公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製することができる。

#### (e) モノクローナル抗体の結合領域の利用

モノクローナル抗体は HIV 抗原に結合することで感染阻止、および HIV ウィ  
10 ルスの中和、排除を行う活性を有するが、その際には H 鎖ではどの V 領域遺伝  
子を用いているか、どの D 領域の遺伝子、J 領域遺伝子を用いているか、さらに  
N 配列が挿入されているか、またどの L 鎖の V 領域遺伝子を用いているか、J 領  
域遺伝子を用いているかが高親和性抗体作製の基盤になる。しかし、結合親和性  
15 に関しては、これらに加えて、末梢のリンパ組織で誘導される V 領域遺伝子の体  
細胞突然変異の程度によって大きく変化する。ここではモノクローナル抗体の抗  
原結合に関わる領域、すなわち H 鎖と L 鎖のそれぞれ 3 つの CDR 領域の構造に  
よって、体細胞突然変異の程度が決まる。したがって、本発明で得られる高親和  
性の結合領域の情報を用いれば、ヒトの EB ウィルスでトランスフォームした記  
憶 B 細胞株で抗 HIV 抗体産生細胞を樹立して、その V 領域にここで得られてい  
る情報を直接遺伝子操作技術で導入することによって高親和性抗体を得ることも  
20 可能である。

#### (4) 抗体断片、ヒト型化抗体又はヒト化抗体

上記の抗体の断片及び V 領域の一本鎖抗体も本発明の範囲内である、抗体の断  
片としては、前述したポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体の一部分の領  
25 域を意味し、具体的には  $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 、 $Fab$ 、 $Fv$ (variable fragment of antibody)、  
 $sFv$ 、 $dsFv$ (disulphide stabilized  $Fv$ )、あるいは  $dAb$ (single domain antibody)  
等が挙げられる。一本鎖抗体は、 $V_L$ (L 鎖可変領域)と  $V_H$ (H 鎖可変領域)をリン

カーでつないだ構造を持つ。

本発明の高親和性抗体は、ヒト型化抗体やヒト抗体でも良い。これらの抗体は、免疫系をヒトのものと入れ換えた哺乳動物を用いて、該哺乳動物を免疫して、通常のモノクローナル抗体と同様に直接ヒト抗体を作製することができる。

- 5 ヒト型化抗体を作製する場合は、マウス抗体の可変領域から相補性決定領域 (complementarity determining region; CDR) をヒト可変領域に移植して、フレームワーク領域 (FR) はヒト由来のものを、CDR はマウス由来のものからなる再構成した可変領域を作製する。

次にこれらのヒト型化された再構成ヒト可変領域をヒト定常領域に連結する。

- 10 ヒト型化抗体の作製法は、当分野において周知である。

ヒト抗体は、一般に V 領域の抗原結合部位、すなわち超過変領域 (Hyper Variable region) についてはその特異性と結合親和性が問題となるが、構造的にどの動物で作製してもかまわない。一方 V 領域のその他の部分や定常領域の構造は、ヒトの抗体と同じ構造をしていることが望ましい。ヒトに共通の遺伝子配列

- 15 については遺伝子工学的手法によって作製する方法が確立されている。

#### (5) 抗体の特性

本発明の GANP トランスジェニック非ヒト哺乳動物より産生される抗体は、以下の (i) ~ (iv) の少なくとも 1 つの性質を有する。

- 20 (i) HIV の外被膜にある分子量 120kD の糖タンパク質抗原 gp120 と結合して、HIV を中和する。

(ii) HIV に感染された細胞の表面に結合することによって、感染された細胞と感染されない T 細胞により誘発される合胞体の形成を阻止する。

(iii) gp120(308-330) の領域の少なくとも一部のエピトープを認識する。

- 25 (iv) gp120(308-330) 領域の少なくとも一部に対し、高親和性 ( $KD=1 \times 10^{-9}(M)$  以下) に結合する。

合胞体とは、感染細胞が非感染細胞を取り込んで一つの細胞になることをいう。



in vitro で HIV を細胞と培養すると、合胞体が形成されることがあり、このような合胞体は、生存できずに死滅する。HIV の中でも合胞体を作りやすい SI 型 HIV の感染者では、CD4<sup>+</sup>リンパ球の減少が早く、エイズへの進展が早く起こることが知られている。

5

## 6. 医薬組成物

本発明の高親和性抗体は、AIDS の病原である HIV を抗原として、その活性を中和させる作用を有するため、AIDS の治療又は予防用医薬組成物として有用である。本発明の医薬組成物は、本発明の高親和性抗体又はその断片を有効成分として含み、さらに薬学的に許容される担体を含む医薬組成物の形態で提供することが好ましい。

ここで「薬学的に許容され得る担体」とは、賦形剤、希釈剤、増量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等が挙げられる。そのような担体の一つ以上を用いることにより、注射剤、液剤、カプセル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態の医薬組成物を調製することができる。これらの医薬組成物は、経口あるいは非経口的に投与することができる。非経口投与のためのその他の形態としては、一つまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される注射剤などが含まれる。

本発明の薬剤の投与量は、患者の年齢、性別、体重及び症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該薬剤に含有される活性成分である高親和性抗体の種類などにより異なるが、通常成人一人当たり、一回につき 10  $\mu$ g から 1000mg、好ましくは 10  $\mu$ g から 100mg の範囲で投与することができるが、この範囲に限定されるものではない。体液量は、体重を 60 kg とすると 5 リットルと産出できる。抗体の有効な濃度は in vitro の実験では 5 ~ 50  $\mu$ g/ml である場合が多く、単純に計算すると 25 ~ 250mg の抗体が少なくとも数日間体内で存在することが望ましい。

例えば、注射剤の場合には、例えば生理食塩水あるいは市販の注射用蒸留水等の薬学的に許容される担体中に  $0.1 \mu\text{g}$  抗体/ml 担体 $\sim$  $10\text{mg}$  抗体/ml 担体の濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。このようにして製造された注射剤は、処置を必要とするヒト患者に対し、1回の投与において  $1\text{kg}$  体重あたり、 $1 \mu\text{g}$  $\sim$  $100\text{mg}$  の割合で、好ましくは  $50 \mu\text{g}$  $\sim$  $50\text{mg}$  の割合で、1日あたり1回 $\sim$ 数回投与することができる。投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射あるいは腹腔内注射などが挙げられるが、好ましくは静脈内注射である。また、注射剤は、場合により、非水性の希釈剤（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類など）、懸濁剤あるいは乳濁剤として調製することもできる。そのような注射剤の無菌化は、フィルターによる濾過滅菌、殺菌剤の配合等により行うことができる。注射剤は、用時調製の形態として製造することができる。即ち、凍結乾燥法などによって無菌の固体組成物とし、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することができる。

15

## 7. HIV 検出キット

本発明の高親和性抗体は、疾患の診断、治療又は予防のための薬剤として有用である。

本発明の抗体を用いた HIV 感染の検出は、被験者から採取した検体、例えば唾液や血液等と本発明の抗体又はその断片とを抗原抗体反応によって結合させ、結合した抗体量により検体中の目的とする抗原の量を測定することにより行う。抗体量の検出は、公知の免疫学的測定法に従って行えばよく、例えば、免疫沈降法、免疫凝集法、標識免疫測定法、免疫比懸濁法などを用いることができる。特に、標識免疫測定法が簡便且つ高感度という点で好ましい。標識免疫測定法では、検体中の抗体価は標識抗体を用いて直接検出した標識量で表すほか、既知濃度あるいは既知抗体価の抗体を標準液として相対的に表してもよい。すなわち、標準液と検体を測定計により測定し、標準液の値を基準にして検体中の抗体価を相対的

20  
25

に表すことができる。標識免疫測定法としては、公知の測定法、例えば ELISA 法、EIA 法、RIA 法、蛍光免疫測定法(Fluoroimmunoassay : FIA)、化学発光免疫測定法(Luminescence immunoassay)などを任意に利用することができる。

また、本発明の高親和性抗体を利用することにより、AIDS 治療薬の薬効評価  
5 を高感度に行うことができる。本発明の高親和性抗体を利用した薬効評価方法は、  
AIDS 患者あるいはヒトリンパ細胞を移入して作製した AIDS モデル動物  
(SCID-Hu マウス) に対して薬剤を投与後、これら生体中の HIV あるいは各モデル動物に対する免疫不全ウイルスの量を本発明の抗体を用いて検出し、その量を比較することにより、生体中の抗原の量を通して AIDS 治療薬としての薬効を  
10 評価することができる。その際、従来の抗体に比べて 2 倍から 100 倍の感度を有することが期待できる。

本発明の高親和性抗体は、各種疾患診断用キットの形態で提供することができる。該キットは、本発明の診断方法や本発明の薬効評価方法に使用することができる。また、輸血製剤や、生体サンプルの HIV ウイルス感染有無のチェックをす  
15 るための、高感度で、敏速で、簡便なキットとして使用できる。本発明のキットは以下の(a)及び(b)から選ばれる少なくとも一つ以上を含む。

(a)本発明の抗体又はその標識物

(b)前項(a)記載の抗体又はその標識物を固定した固相化試薬

ここで、抗体の標識物とは、酵素、放射性同位体、蛍光化合物、または化学発  
20 光化合物によって標識されたものを意味する。

本発明のキットは、上記の構成要素の他、本発明の検出を実施するための他の試薬、例えば標識物が酵素標識物の場合は、酵素基質（発色性基質等）、酵素基質溶解液、酵素反応停止液、あるいは検体用希釈液等を含んでいても良い。

25 以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

本実施例は、通常免疫に用いられることの多い Balb/c マウス、野生型 (WT) マウス及び GANP トランスジェニック (Tg) マウスの 3 種のマウスに、免疫抗原として HIV の中和活性が期待できる HIV24NL43 (308-330) のペプチドをキャリアー蛋白に結合したものを免疫した。それぞれのマウスの中から各 2 匹を用いて細胞融合を行い、ELISA 法、Biacore による測定にてスクリーニングし、陽性ハイブリドーマを得た。さらに各ハイブリドーマから得られた精製抗体を用いて、ELISA 法および Biacore を用いた解析を実施した。

その結果、GANP トランスジェニック (Tg) マウスから得られたモノクローナル抗体 (3 クローン) は、かなりの高親和性モノクローナル抗体であり、親和性の指標となる解離定数は高いものでは  $KD (KD = k_{diss} / k_{ass}) = 9.90 \times 10^{-11} (M)$  であった。

#### 実施例 1 : GANP トランスジェニック (Tg) マウスの作製

マウスへの導入用遺伝子は、pLG ベクターの EcoRI サイトに 5.3 kb のマウス GANP 遺伝子を挿入して作製した。このベクターはヒト免疫グロブリンイントロンエンハンサー領域 (2 kb EcoRI フラグメント) を持ち、B 細胞での強力な発現を行う、特異的ベクターである。この遺伝子を直線化してマウスに遺伝子導入を行った。マウス GANP 全長 cDNA を含む線状化した pLG vector (Koike, M. et al. Int. Immunol. 7, 21-30 (1995)) を C57BL/6 マウスの受精卵にマイクロインジェクションした。マウスの尾のゲノム DNA および以下のプライマー及び反応液を用いて導入遺伝子の存在についてスクリーニングした (図 1、上パネル)。図 1 上パネルにおいて、5.3kb 付近のバンドは GANP 遺伝子のものである。

1-5' プライマー : 5'-TCCCGCCTTCCAGCT GTGAC-3' (配列番号 7)

1-3' プライマー : 5'-GTGCTGCTGTGTTATGTCCT-3' (配列番号 8)

反応液組成 :



DNA (50 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
10x buffer	2.0 $\mu$ l
2.5 mM dNTP mix	2.0 $\mu$ l
1-5' primer (10 $\mu$ M)	0.8 $\mu$ l
1-3' primer (10 $\mu$ M)	0.8 $\mu$ l
Z-Taq DNA polymerase	0.1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	13.3 $\mu$ l

反応条件：

[98°C 5 sec; 59°C 5 sec; 72°C 10 sec] × 35 サイクル

4°C

5

GANP mRNA の発現が亢進しているか否かは、RT-PCR で確認した。

全 RNA は、脾臓又は脾臓 B 細胞から Trizol(Invitrogen)を用いて抽出し、RT-PCR は、2 種のプライマー1-5'及び 1-3'を用いて行い、cDNA を合成した (Kuwahara, K. et al., Blood 95, 2321-2328 (2000))。GANP 転写物はアガロースゲル電気泳動により検出した。β-アクチン転写物は対照として用いた。

10

その結果、GANP トランスジェニックマウスは、B 細胞で GANP の発現の増加を示し (図 1、下パネル)、骨髓、脾臓及びリンパ節の細胞の表層マーカー分析において、B 系細胞の通常の分化を示した。

15

## 実施例 2：抗体の作製

### (1) 材料

(a) 動物： Balb/c マウス、野生型 (WT) マウスと GANP トランスジェニック (Tg) マウス

(b)免疫抗原：HIV24NL43 ペプチドKLHコンジュゲーション

20

(c) ELISA 抗原：HIV24NL43 ペプチド (配列：CNNTRKSIRI QRGPGRAFVT IGKI (配列番号 9))

(d)ミエローマ細胞：P3-X63.Ag8.U1

(e) 2 次抗体 : HRP 標識抗マウス抗体 IgG・A・M

(2) 方法

上記 3 種のマウスの各 5 匹に、免疫抗原として NL43 ペプチド（キャリアータンパク質 : KLH）を、2 週間おきに 3 回免疫し、3 回免疫後採血抗血清を用いて

5 抗体価を ELISA 法にて測定した。

この中から、力価の高いマウス各 2 匹から抗体産生細胞（脾細胞）を採取し、脾細胞と P3U1 ミエローマ細胞との細胞融合を実施した。GANP-Tg マウスの脾細胞数が  $0.2 \times 10^5$ /ウェルになるようにまきこみ、それぞれ、Balb/c マウス : 5448 クローン、野生型 (WT) マウス : 1888 クローン、GANP トランスジェニック (Tg)

10 マウス : 2016 クローンを HAT 培地にて培養した。

HAT 培養 9 日後の培養上清を用いて、NL43 ペプチド（1 マイクロ g/mL）を固相化抗原として ELISA 法を実施した。GANP-Tg マウスおよび WT の培養上清の母集団のそれぞれから、ELISA の結果にて 490nm 吸光度 1.50 以上のクローンを選出し、HT 培地にてクローニングを実施した。

15 HT 培養 9 日後の培養上清を用いて、NL43 ペプチド（1 マイクロ g/mL）を固相化抗原として ELISA 法を実施した結果、Balb/c マウスは 3 クローン（クローン名 : B1-10, B2-24, B2-27）、野生型 (WT) マウスは 9 クローン（クローン名 : W1-2, W1-7, W1-8, W1-10, W1-21, W1-43, W1-45, W1-63, W1-84）、GANP トランスジェニック (Tg) マウスは 8 クローン（クローン名 : G1-22, G1-68, G1-124, 20 G1-165, G1-181, G2-231, G2-10, G2-25）のハイブリドーマを樹立した。

このうち、G2-25 は「Anti-NL43mono. Clone No.G2-25 ハイブリドーマ細胞」と称し、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6（郵便番号 305-8566））に、2004 年 2 月 25 日付で FERM BP-08644 としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。  
25

GANP-Tg マウス、WT のそれぞれのクローンを RPMI 培地にて培養し、さらに、無血清培地である SFM 培地にて培養し、Protein G 精製によって、抗ペプチ

ドモノクローナル精製抗体を作製した。

### 実施例 3：親和性測定

上記実施例 2 で作製した各モノクローナル抗体を用いて、以下の評価検討を

5 施した。

抗体の親和性を評価するにあたり、ELISA 法と Biacore による解析を実施した。

まず、ELISA 法は、HIV24NL43 ペプチド 1 マイクロ g/mL をそれぞれ固相  
化抗原として用い、室温にて 1 時間固相化した。PBSTween20 洗浄後、2.0% skim  
milk にてブロッキングを実施した。さらに PBSTween20 洗浄後、評価する抗ペ  
10 プチドモノクローナル抗体 (0.457~1 マイクロ g/mL) を用いて、室温にて 1 時  
間反応させた。次に、サンプルを PBSTween20 洗浄後、HRP 標識抗マウス IgG・  
A・M と室温にて 1 時間反応させた。さらに、PBSTween20 洗浄し、オルトフェ  
ニレンジアミン(OPD)にて 5 分間発色させ、2 N 硫酸を用いて反応を停止した。

吸光度は、ELISA PLATE READER を用いて、490nm にて測定した。

15 ELISA の結果を図 2 に示す。

GANP-Tg マウスを用いることにより、極めて高い結合能を有する 3 つの抗体  
が作製された (図 2、吸光度 1.4~2.1 付近)。これらのモノクローナル抗体のク  
ローン名は、吸光度の高い順に G1-181、G2-10、G2-25 である。

次に、Biacore を用いて物理化学的結合能を調べた。

20 Biacore による解析は、HIV24NL43 ペプチドをリガンドとして Biacore セン  
サーチップに結合させたものに、アナライト溶液として、抗ペプチドモノクロー  
ナル抗体を用いて、それぞれの結合速度定数 ( $k_{\text{ass}}$ )、解離速度定数 ( $k_{\text{diss}}$ )、  
そして親和性の指標となる解離定数  $KD$  ( $KD = k_{\text{diss}} / k_{\text{ass}}$ ) を算出した。 $KD$  が  
低い程、親和性は高いと評価される。

25 抗体の親和性の総合評価として、各クローンの解離定数と ELISA の結果を合  
わせて、図 3 に示す。図 3 において、クローンと解離定数との関係は以下の通り  
である。

クローン	解離定数 (M)
G1-181	$1.09 \times 10^{-8}$
G2-10	$9.90 \times 10^{-11}$
G2-25	$1.51 \times 10^{-10}$

抗体の結合親和性を検討するには Biacore による感度測定による方法が現在のところ最も有効であるが、この際の解離定数は単位時間当たりに結合する抗体の結合速度定数を結合した抗体の解離定数で割った数値として便宜的に算出される。抗体の活性はこのペプチドに対する親和性に加えて、抗体がどれだけ短時間で抗原に結合しうるかも重要な要素である。生体内でできるだけ速やかにウイルスと結合し、その結果ウイルス抗原の分子構造に変化を加えて、一層強固な結合状態に入ることにも期待できる。G1-181 クローンは解離定数算出ではそれほど高いとはいえないものの、結合定数のプロファイルでは最も急速に多くの抗原分子と結合するという点で優れている。

10 通常、モノクローナル抗体作製のために用いる Balb/c マウスから得られた抗体は、解離定数  $KD = 4.97 \times 10^{-6} \sim 5.68 \times 10^{-9}$  (M) で、低親和性でかつ少数の抗体しか得ることができず、陰性コントロールの野生型 (WT) マウスにおいても、解離定数  $KD = 2.81 \times 10^{-5} \sim 3.11 \times 10^{-9}$  (M) の範囲までしか得られず、限界があった。

15 これらに対して、GANP トランスジェニック (Tg) マウスにおいては、解離定数  $KD = 9.90 \times 10^{-11}$  (M) という高親和性抗体 (G2-10) を得ることができ、この親和性は、Balb/c マウスのクローンの 57 倍、野生型 (WT) マウスの 31 倍も高親和性であるといえる。

#### 20 実施例 4 : モノクローナル抗体と NL43 エンベロープとの結合

上記実施例 2 で作製した抗 HIV ペプチド (NL43) モノクローナル抗体が実際の NL43 (HIV のエンベロープタンパク質) に対して *in vitro* で結合能を有するかを明らかにするために、結合アッセイを実施した。

##### (1) 材料



## (a) 抗 HIV (NL43)精製抗体

実施例 2 で作製した抗体を用いた。具体的には、以下に示す抗体を使用した。

Balb/c マウス：3 クローン（クローン名：B1-10, B2-24, B2-27）、

野生型（WT）マウス：9 クローン（クローン名：W1-2, W1-7, W1-8, W1-10,

5 W1-21, W1-43, W1-45, W1-63, W1-84)

GANP トランスジェニック（Tg）マウス：8 クローン（クローン名：G1-22, G1-68, G1-124, G1-165, G1-181, G1-231, G2-10, G2-25)

また、対照として 70Z/3 2-28、0.5  $\beta$  及び anti-CD19 を用いた。

## (b) プラスミドベクター

10 pLP-IRES2-EGFP (Clontech 社)、pLP-NL4-3 envelope-EGFP を使用した。

本ベクターを用いることにより、単一の RNA からの目的遺伝子(NL43)と EGFP 両方の翻訳が可能となるので、蛍光を示す細胞のほぼ 100%は NL43 を発現する。

## (c) 遺伝子導入試薬

Effectene Transfection Reagent (QIAGEN)を使用した。

## 15 (d) 2 次抗体

APC 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (BD Pharmingen)を使用した。

## (2) 方法

結合アッセイは、エンベロープ(NL43)の発現をモニターするために、ヒト胎児腎癌細胞株（293 T 細胞）に GFP を導入し、その細胞に抗 HIV (NL43)精製抗体  
20 と APC 標識 2 次抗体を反応させ、細胞表面を染色する。次にフローサイトメトリーにより two-color 解析を行い、その蛍光強度によりエンベロープへの結合能をみるものである。

GFP 遺伝子の細胞への導入は、ヒト胎児腎癌細胞株（293 T 細胞）を 10 cm デイッシュに 400000 個播き、1 日培養した後、Effectene Transfection Reagent  
25 を用い、pLP-IRES2-EGFP (Clontech 社) 又は pLP-NL4-3-EGFP をそれぞれ 5  $\mu$ g 導入した。36 時間培養した後、細胞を集め細胞表面染色を行った。細胞表面染色は、各 10  $\mu$ g/mL の抗 HIV (NL43)精製抗体と、APC 標識ヤギ抗マウス IgG

抗体を 50 倍希釈したものを用いて、それぞれ氷上にて 30 分反応させた。

各抗 HIV モノクローナル抗体のエンベロープへの結合能を、FACS Calibur を用いて平均蛍光強度 (MFI) を算出することにより評価した。

### (3) 結果

- 5 結合アッセイの結果を図 4 及び図 5 に示す。図 4 及び 5 は、GFP 陽性(+)と陰性(-)のそれぞれにゲートをかけた場合の平均蛍光強度 (MFI) を棒グラフにしたものである。棒グラフは、pLP-NL4-3 envelope-EGFP を導入させた細胞において、GFP 陽性での APC 平均蛍光強度 (MFI) が高いほど、エンベロープに有効に結合することを示す。結合アッセイの結果、GANP トランスジェニック (Tg)
- 10 マウスにおいて作製したモノクローナル抗体 (例えば G1-22、G1-68、G2-10、G2-25 クローン) は、エンベロープへの結合能を有することがわかった。

### 実施例 5 : モノクローナル抗体の中和活性

- 実施例 4 で使用した精製抗体を用いて、実際にそのモノクローナル抗体が
- 15 HIV-1 ウイルスの感染を阻止する能力を有するかを確認するために、ヒト CD4 陽性細胞における中和活性実験 (ウイルス感染阻止実験) を行った。

#### (1) 材料

##### (a) 抗 HIV (NL43) 精製抗体

- 実施例 4 で用いた各抗 HIV (NL43) 精製抗体を使用した。また、対照として 70Z/3
- 20 2-28 及び 0.5  $\beta$  を用いた。

##### (b) HIV-1 保存株

非働化した牛胎児血清 10% を添加した RPMI-1640 培地にて PM1 細胞を増殖させ、-80°C で保存したものを使用した。

##### (c) $\beta$ ガラクトシダーゼ検出キット

- 25  $\beta$  ガラクトシダーゼ検出キットは、Galacto-star(TROPIX)を使用した。エイズウイルス感染阻止 (中和活性) 実験において、本キットは、CD4 細胞(MAGI/CCR5) から産生される  $\beta$  ガラクトシダーゼを化学発光基質 (Reed-Muench 方法) を用

いて検出することによって、CD4 細胞の生死(生細胞数)を判定するものである。

## (2) 方法

CD4細胞(MAGI/CCR5)を1日培養した後、一定のエイズウイルスを加えると、エイズウイルスにより感染した細胞からは、βガラクトシダーゼは検出されなくなる。このシステムにおいて、抗体の中和活性の測定は、エイズウイルス添加直前に、効力が異なる抗 HIV (NL43)精製抗体を上記 MAGI/CCR5 細胞にあらかじめ添加しておき、エイズウイルスを添加したときにエイズウイルスの感染を阻止できるか否かを、βガラクトシダーゼの産生量を指標として評価するものである。

この感染測定システムは、ウイルス感染に必要なウイルス量を高感度に決定することを可能とする。MAGI/CCR5 細胞による予備検討により、添加するウイルス量は、ウイルスの 50%終末点 (TCID<sub>50</sub>) を目安として、500 と決定した。

細胞を HIV に感染させるために、MAGI/CCR5 細胞を  $1 \times 10^4$ /ウエルになるように 96 プレートで培養した。1日後、各抗体 50 μL を添加し、37℃で 30 分間インキュベートした。続いて 10 μg/mL の DEAE-dextran に反応させた HIV-1 溶液 50 μL を添加し、インキュベートした。添加したそれぞれの抗体濃度は、0.5、5 または 50 μg/mL の 3 濃度で実施した。2日後、βガラクトシダーゼ活性を Galacto-star(TROPIX)を用いて測定した。

## (3) 結果

中和活性実験の結果を図 6 及び図 7 に示す。各抗体の中和活性を測定した結果、GANP トランスジェニック (Tg) マウスにおいて作製した G2-10 及び G2-25 クローンは、各濃度において表 1 に示す HIV 中和活性を持つことがわかった。

表 1

クローン名	濃度	中和活性（感染阻止能力）
G2-10	50 $\mu$ g/mL	98.2% $\pm$ 1.2
	5 $\mu$ g/mL	93.5% $\pm$ 1.7
	0.5 $\mu$ g/mL	70.9% $\pm$ 9.7
G2-25	50 $\mu$ g/mL	101.2% $\pm$ 0.4
	5 $\mu$ g/mL	97.6% $\pm$ 1.6
	0.5 $\mu$ g/mL	86.3% $\pm$ 2.4
0.5 $\beta$	0.5 $\mu$ g/mL	86.5% $\pm$ 3.0

実際に治療用抗体として利用する際には、微量で感染阻止する能力を有することが重要となるため、G2-10 及び G2-25 による上記の値は、非常に低濃度で HIV 5 感染防止能力を示し、有効な HIV 治療薬として利用可能と考えられる。

中和活性測定陽性コントロールには HIV エンベロープそのものを免疫して作製されたとして用いている抗体（0.5  $\beta$ ）を用いた（第 2797099 号特許）。0.5  $\beta$  の 0.5  $\mu$ g/mL においての中和活性能力は 86.5  $\pm$  3.0 に及ぶが、上記 2 クローン、特に G2-25 における in vitro 感染阻止能力は、その抗体（0.5  $\beta$ ）と同等または 10 それ以上であるといえる。

これに対して、野生型（WT）マウスにおいて作製した 9 クローンの抗体の中和活性は、低濃度 0.5  $\mu$ g/mL においてほとんど中和活性が認められなかった。

実施例 4 及び 5 の結果は、GANP トランスジェニック（Tg）マウスで作製した抗エイズペプチド（NL43）モノクローナル抗体が、実際に in vitro で HIV-1 ウ 15 イルスエンベロープに対して結合し（実施例 4）、その結合が強力な中和活性（感染阻止力）を有することを示している（実施例 5）。更に重要なことは解離定数 KD 値（ $9.90 \times 10^{-11}$ ）を示すことから、一度結合するとその後長期間ウイルスと結合し続けることのできる高親和性抗体グループであるという点である（実施例 3）。

20 このように強力なウイルス中和効果を持ち、抗原と解離する速度が著しく低い高親和性モノクローナル抗体は、これまでに多くの研究室で試みられてきた HIV-1 ウイルスの遺伝子配列から推定するペプチド配列を基に作製した通常のモ



ノクローナル抗体作製技術では得ることのできない優れたものである。野生型 C57BL/6 マウスに免疫して作製したモノクローナル抗体では  $50 \mu\text{g/ml}$  の濃度で初めて高い中和活性を示すのに対して、GANP トランスジェニック (Tg) マウス由来の G2-10, G2-25 モノクローナル抗体は両者ともわずか  $0.5 \mu\text{g/ml}$  濃度においてそれらに匹敵する中和活性を発揮している。単純計算ではタンパク質濃度あたり 100 倍の中和活性を示し、また、その結合が  $10^2$  オーダーの長期間に渡って持続することが期待できる。

これらのマウス抗 HIV-1 モノクローナル抗体は、(a)ウイルスペプチド配列に特異的な高親和性抗体であること、(b)実際に *in vitro* で HIV-1 ウイルスエンベロープに対して結合すること、(c)*in vitro* でのヒト CD 4 陽性細胞への HIV-1 ウイルス感染を阻止できること、(d)従来法と異なる遺伝子変異マウスによって作製していることから新たなエピトープに対する抗体である可能性があること、(e)この新たな VH 領域は更にバイオテクノロジーによる遺伝子改変を加えることによって更に強力な抗体を作製する基盤情報を提供するという長所を有している。

GANP トランスジェニック (Tg) マウスを用いてエイズウイルスの感染阻止作用を持つ高親和性抗体が速やかに得られるということは、これまでの研究成果とその応用の計画が正当であることを証明したものである。従って、本発明は、感染症に脅かされている現代において画期的な治療法開発につながる発明である点で極めて有用である。

配列表フリーテキスト

配列番号 7 : プライマー

配列番号 8 : プライマー

産業上の利用可能性

本発明により、GANP 遺伝子トランスジェニック非ヒト哺乳動物から得られる、高親和性抗 HIV 抗体、及び該抗体を含む医薬組成物が提供される。本発明の抗体

は、 $KD=1.0 \times 10^{-9}(M)$ 以下の高親和性を有しているため、本発明の抗体を含む医薬組成物は、後天性免疫不全症候群(AIDS)の治療薬として使用することができる。

さらに、本発明により、該抗体を産生する細胞、及び該抗体を利用した HIV の検出キットも提供される。

## 請 求 の 範 囲

1. HIV の gp120 糖タンパク質と結合し、かつ、解離定数が  $KD=1.0 \times 10^{-9}(M)$  以下の抗体又はその断片。
- 5 2. gp120 糖タンパク質のうち第 308-330 番目のアミノ酸配列の少なくとも一部を認識することができる請求項 1 記載の抗体又はその断片。
3. 第 308-330 番目のアミノ酸配列が配列番号 6 に示されるものである請求項 2 記載の抗体又はその断片。
4. ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体である、請求項 1 ～ 3 のいずれ  
10 か 1 項に記載の抗体又はその断片。
5. 受託番号が FERM BP-08644 であるハイブリドーマ細胞により産生される、HIV の gp120 糖タンパク質に対するモノクローナル抗体又はその断片。
6. 請求項 4 又は 5 記載の抗体又はその断片の V 領域を含む、ヒト型化抗体若しくはヒト抗体又はそれらの断片。
- 15 7. 配列番号 6 に示すアミノ酸配列のうち少なくとも一部を含むポリペプチドを抗原として免疫した GANP トランスジェニック非ヒト哺乳動物又はその子孫から採取される、高親和性抗体産生細胞。
8. 受託番号が FERM BP-08644 である、HIV の gp120 糖タンパク質に対するモノクローナル抗体産生細胞。
- 20 9. GANP トランスジェニック非ヒト哺乳動物又はその子孫を、配列番号 6 に示すアミノ酸配列のうち少なくとも一部を含むポリペプチドを抗原として免疫し、得られる動物又は子孫から抗体を採取することを特徴とする、抗 HIV 抗体又はその断片の製造方法。
10. 請求項 7 記載の細胞とミエローマ細胞との融合細胞、又は請求項 8 記載の  
25 モノクローナル抗体産生細胞を培養し、得られる培養物から抗体を採取することを特徴とする、抗 HIV 抗体又はその断片の製造方法。
11. 請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその断片、及び請求項 6 記

載のヒト型化抗体若しくはヒト抗体又はそれらの断片からなる群から選択される少なくとも1つを含有する医薬組成物。

1 2. 後天性免疫不全症候群の治療薬である請求項 1 1 記載の医薬組成物。

1 3. 請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体若しくはその断片、又は請求項

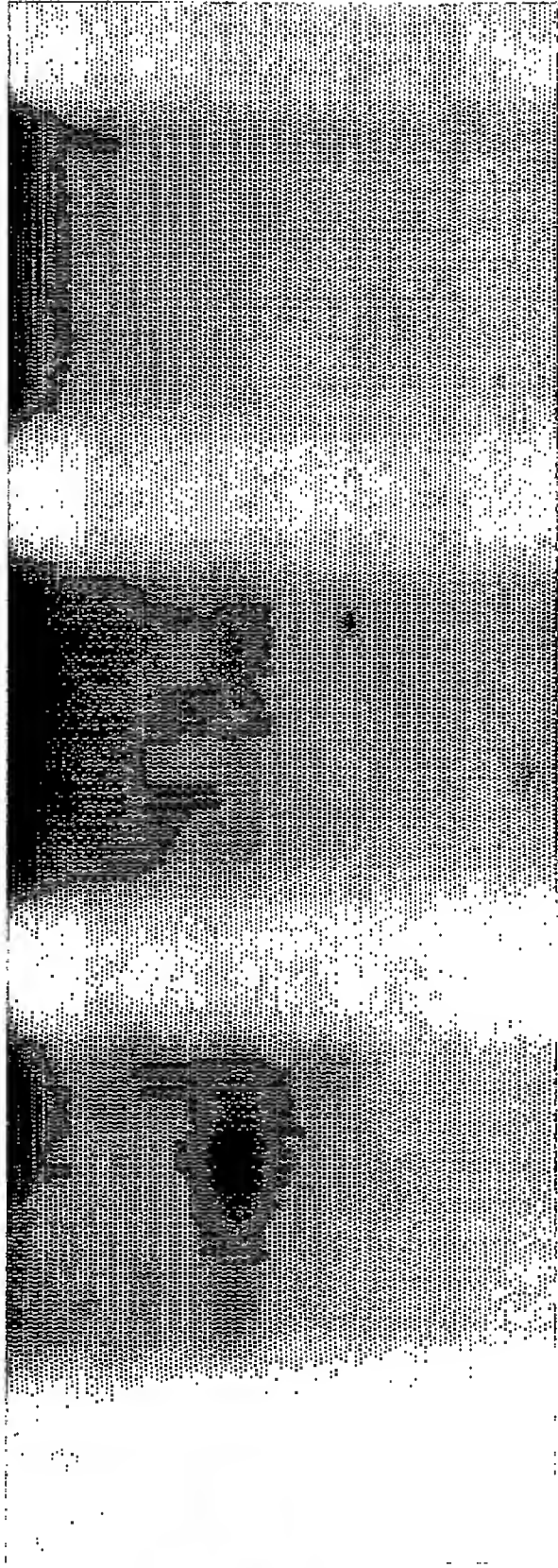
5 6 記載のヒト型化抗体若しくはヒト抗体若しくはそれらの断片と、HIV の gp120 糖タンパク質とを反応させることを特徴とする HIV の検出方法。

1 4. 請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその断片、及び請求項 6 記載のヒト型化抗体若しくはヒト抗体又はそれらの断片からなる群から選択される少なくとも1つを含有する HIV 検出用キット。



図 1

B-Ganp<sup>tg-1</sup>    B-Ganp<sup>tg-2</sup>    野生型



EcoRI 消化

サイクル    22    24    26



野生型    Tg    野生型    Tg    野生型    Tg

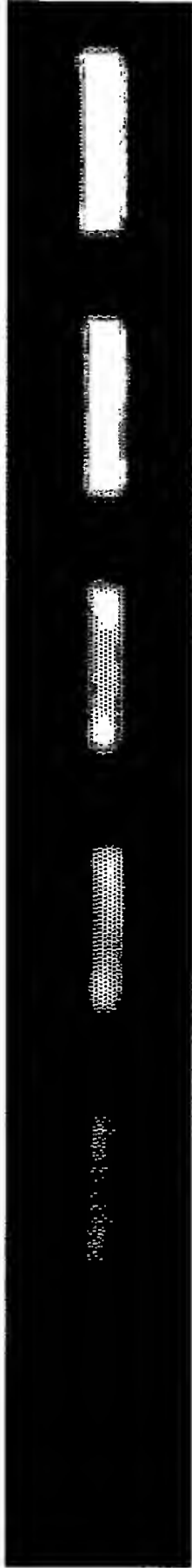


図 2

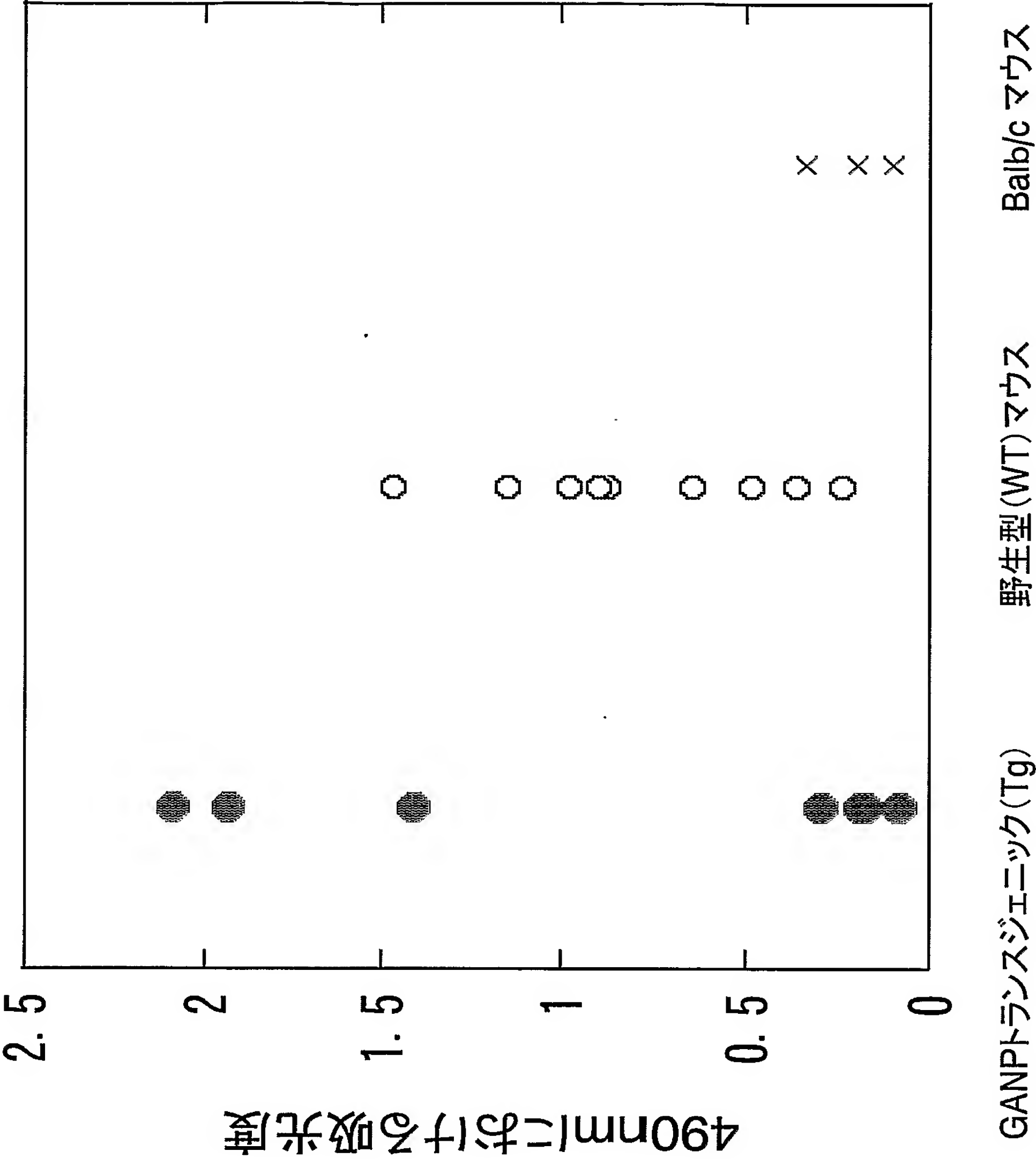


図 3

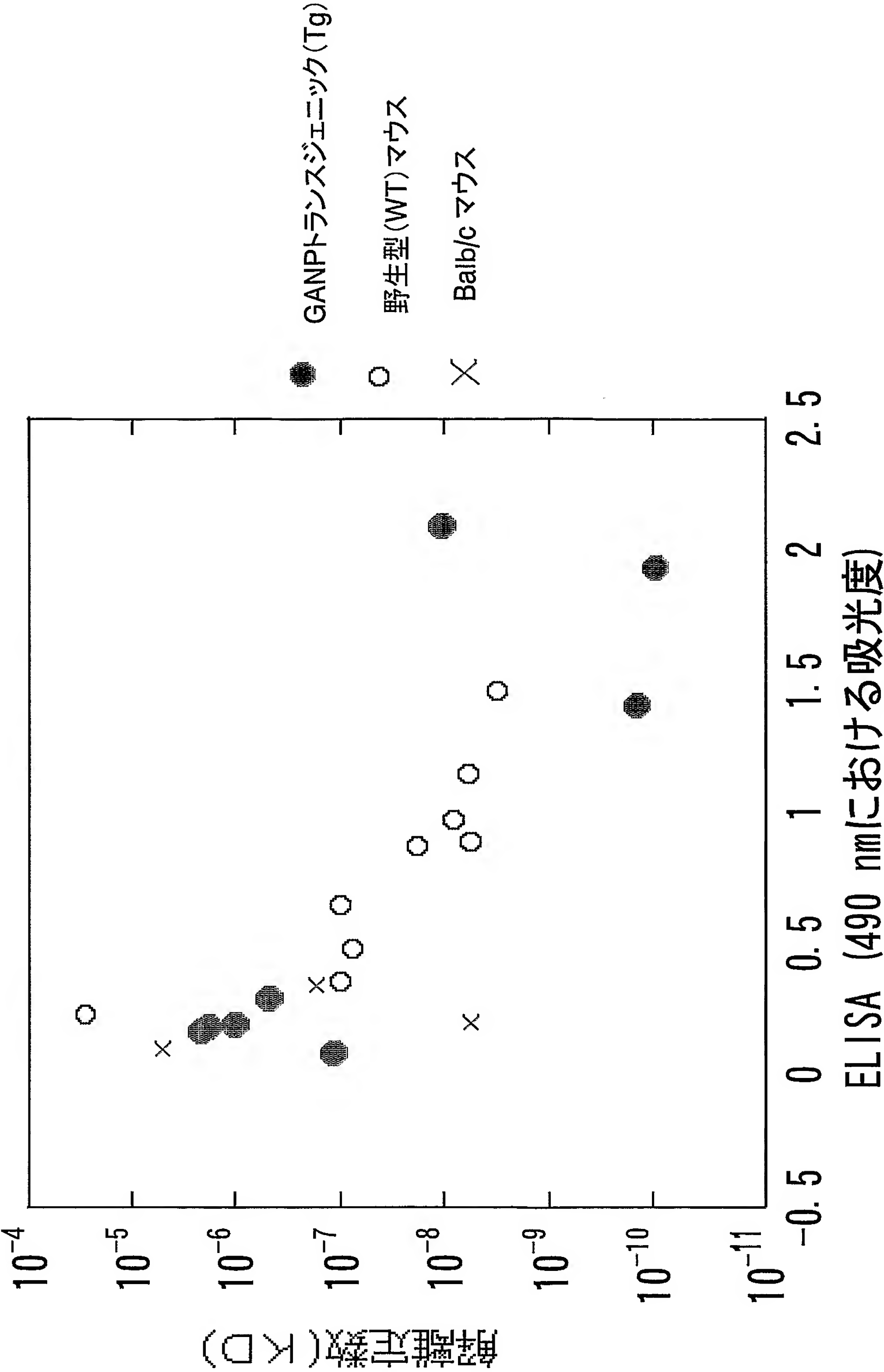
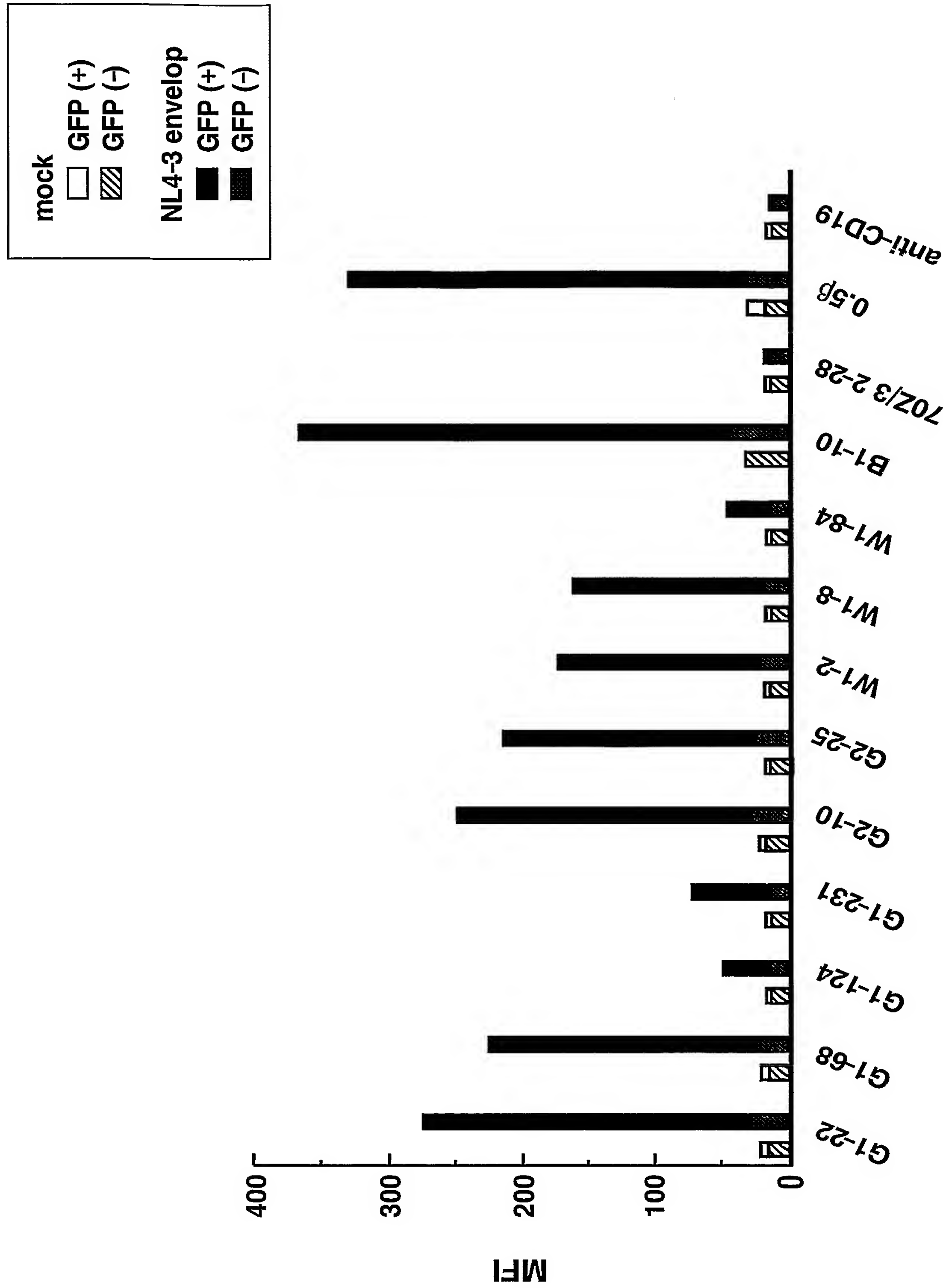


図 4





5

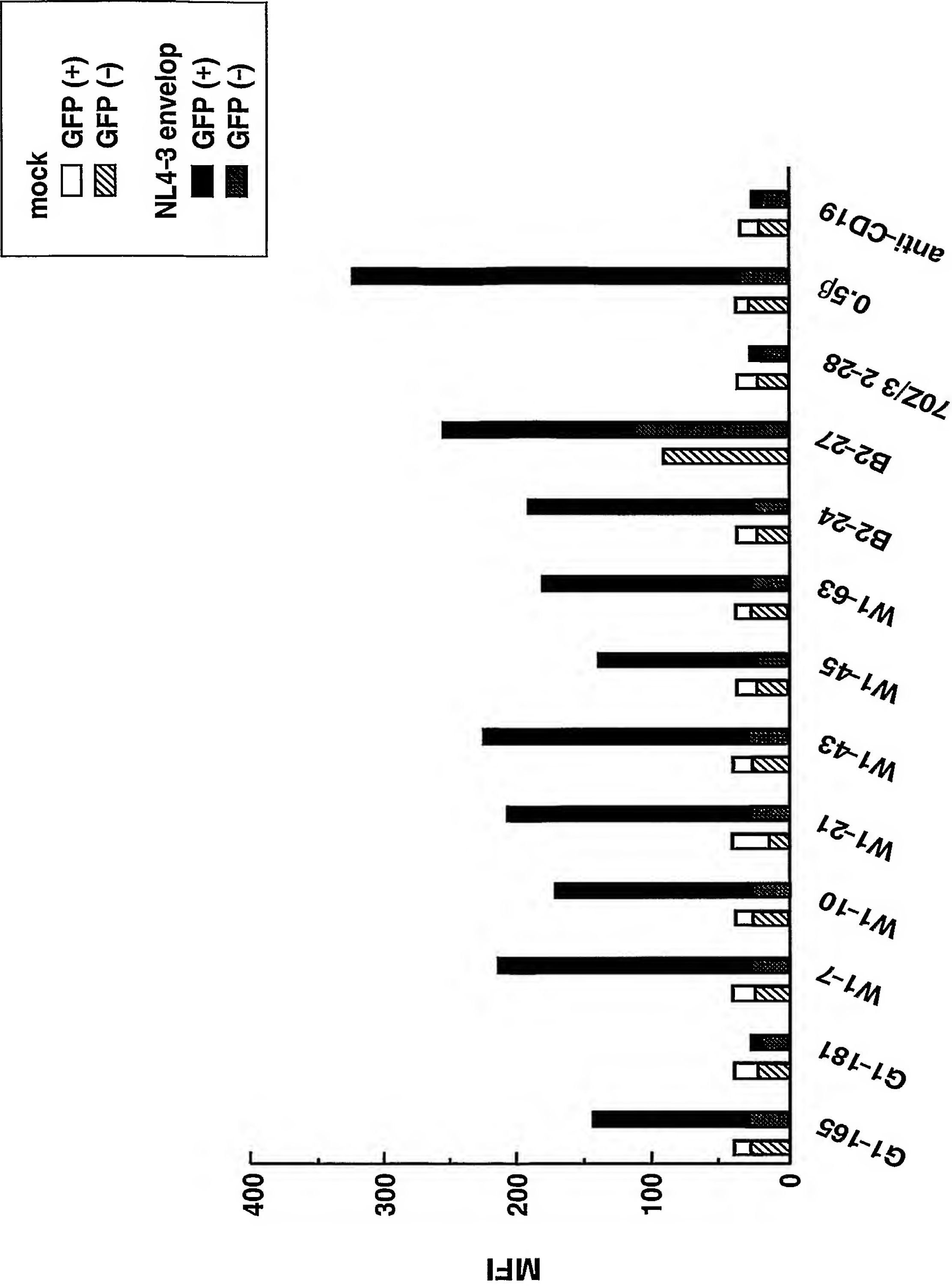


図 6

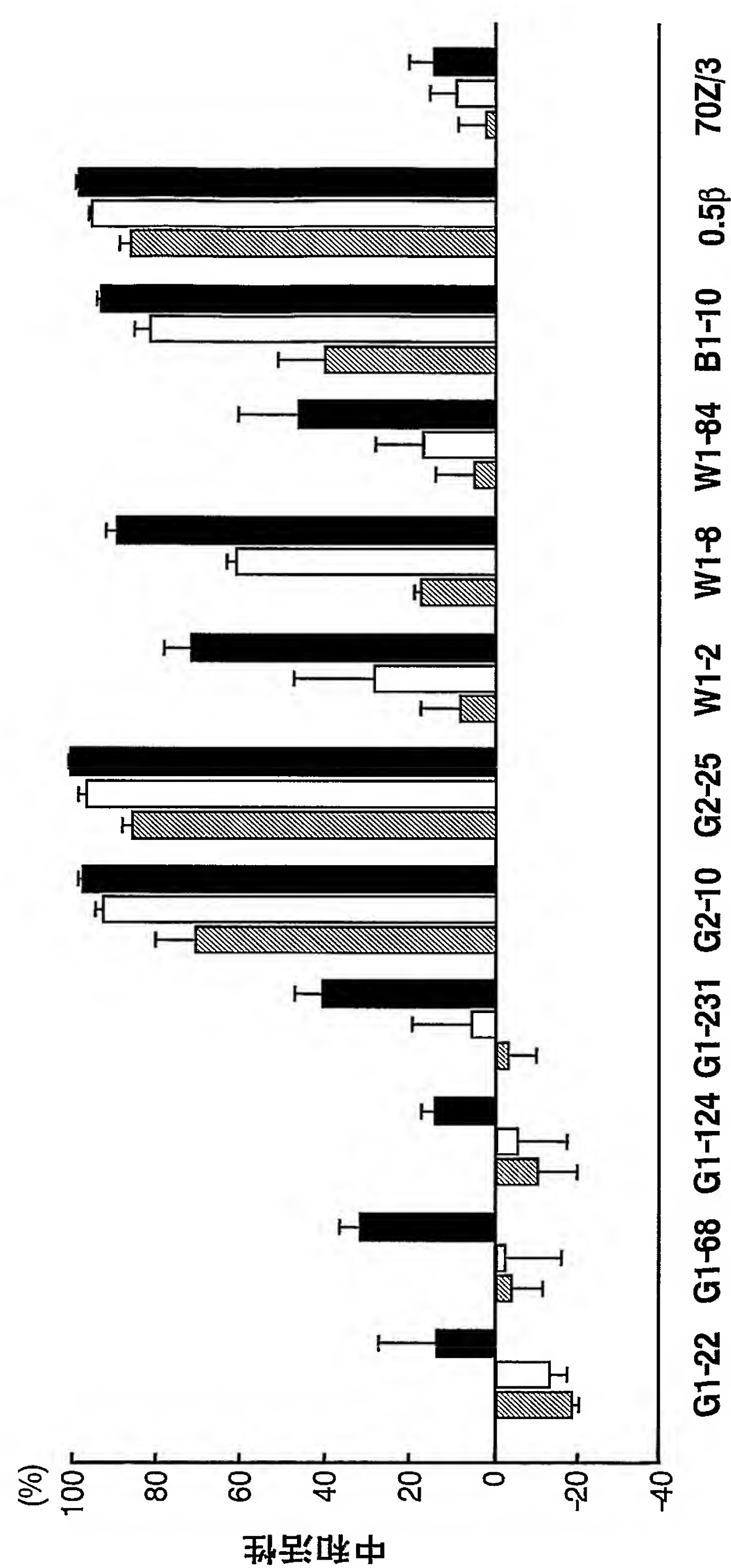
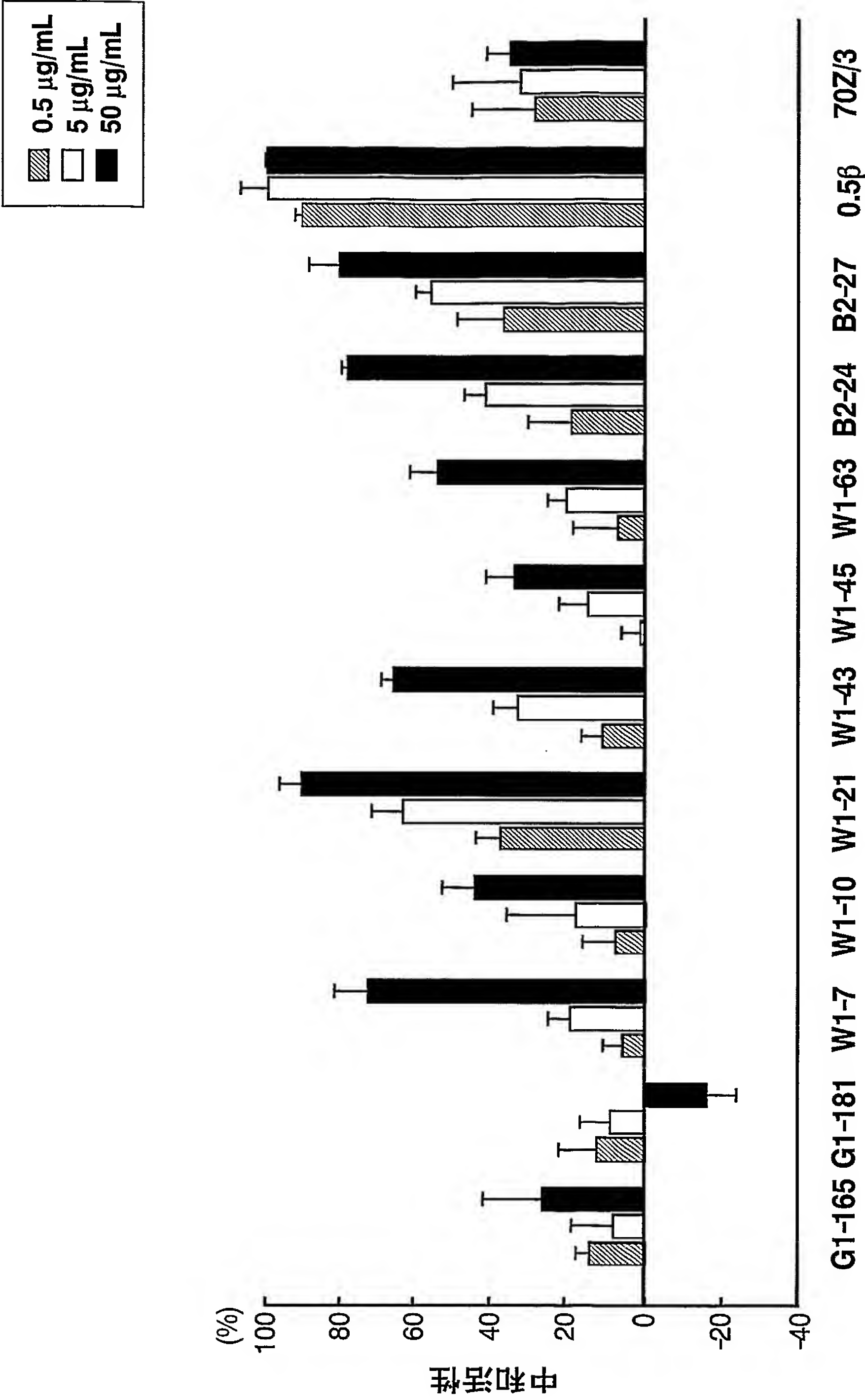


図 7



## SEQUENCE LISTING

<110> Kumamoto Technology & Industry Foundation

<120> anti-HIV antibody

<130> P03-0180 PCT

<150> JP 2003-418655

<151> 2003-12-18

<160> 9

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 6429

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (384).. (6299)

<400> 1

gttgcggtgc ggtgggcccg gtagaggctg cacgcagact gtgggcgagc acaagcgctg 60

gcgacagtgg ccgtatctgg cggacttgct cctccctccg cggcctccgc tgtcccttgt 120

gtctttgccg agttgctgaa ggccttcact agtcttcgct cgaaggcgtc tgttaacctt 180

gcggccggct tccggagtgt taagcatcgg ggataaaaag ctattatttc tagaccaggg 240

catcgcaagt tcgagttacc gggagaaaaa tgagatggtc atcctgagga tgaaggagag 300

cttcccctgg caacagataa tttaaagagg agagctactt gtgtatagtc cataatttatt 360



gccttcagat aattggcttg aag atg cac ccg gtg aac ccc ttc gga ggc agc 413  
Met His Pro Val Asn Pro Phe Gly Gly Ser  
1 5 10

agc cca agt gct ttt gcg gta tct tcc agc acc acg gga aca tat cag 461  
Ser Pro Ser Ala Phe Ala Val Ser Ser Ser Thr Thr Gly Thr Tyr Gln  
15 20 25

act aaa tca cca ttt cga ttt ggc cag cct tcc ctt ttt gga cag aac 509  
Thr Lys Ser Pro Phe Arg Phe Gly Gln Pro Ser Leu Phe Gly Gln Asn  
30 35 40

agc aca ccc agc aag agc ctg gcg ttt tca caa gta cca agc ttt gca 557  
Ser Thr Pro Ser Lys Ser Leu Ala Phe Ser Gln Val Pro Ser Phe Ala  
45 50 55

aca ccc tct gga gga agc cat tct tcc tcc ttg cca gca ttt gga ctc 605  
Thr Pro Ser Gly Gly Ser His Ser Ser Ser Leu Pro Ala Phe Gly Leu  
60 65 70

acc caa acc tca agt gtg gga ctc ttc tct agt ctc gaa tcc aca cct 653  
Thr Gln Thr Ser Ser Val Gly Leu Phe Ser Ser Leu Glu Ser Thr Pro  
75 80 85 90

tct ttc gca gct act tcg agt tcc tct gtg ccc ggc aat acg gca ttc 701  
Ser Phe Ala Ala Thr Ser Ser Ser Ser Val Pro Gly Asn Thr Ala Phe  
95 100 105

agc ttt aag tca acc tct agc gtt ggg gtt ttc cca agt ggc gct act 749  
Ser Phe Lys Ser Thr Ser Ser Val Gly Val Phe Pro Ser Gly Ala Thr  
110 115 120

ttt ggg cca gaa acc gga gaa gta gca ggt tct ggc ttt cgg aag acg 797  
Phe Gly Pro Glu Thr Gly Glu Val Ala Gly Ser Gly Phe Arg Lys Thr  
125 130 135

gaa ttc aag ttt aaa cct ctg gaa aat gca gtc ttc aaa ccg ata ccg 845  
Glu Phe Lys Phe Lys Pro Leu Glu Asn Ala Val Phe Lys Pro Ile Pro

140	145	150	
ggg cct gag tca gag cca gaa aaa acc cag agc cag att tct tct gga			893
Gly Pro Glu Ser Glu Pro Glu Lys Thr Gln Ser Gln Ile Ser Ser Gly			
155	160	165	170
ttt ttt aca ttt tcc cat ccc gtt ggt agc ggg tct gga ggc ctg acc			941
Phe Phe Thr Phe Ser His Pro Val Gly Ser Gly Ser Gly Gly Leu Thr			
	175	180	185
cct ttt tct ttc cca cag gtg aca aat agt tcg gtg act agc tca agt			989
Pro Phe Ser Phe Pro Gln Val Thr Asn Ser Ser Val Thr Ser Ser Ser			
	190	195	200
ttt atc ttt tcg aaa cca gtt act agt aat act cct gcc ttt gcc tct			1037
Phe Ile Phe Ser Lys Pro Val Thr Ser Asn Thr Pro Ala Phe Ala Ser			
	205	210	215
cct ttg tct aac caa aat gta gaa gaa gag aag agg gtt tct acg tca			1085
Pro Leu Ser Asn Gln Asn Val Glu Glu Glu Lys Arg Val Ser Thr Ser			
220	225	230	
gcg ttt gga agc tca aac agt agc ttc agt act ttc ccc aca gcg tca			1133
Ala Phe Gly Ser Ser Asn Ser Ser Phe Ser Thr Phe Pro Thr Ala Ser			
235	240	245	250
cca gga tct ttg ggg gag ccc ttc cca gct aac aaa cca agc ctc cgc			1181
Pro Gly Ser Leu Gly Glu Pro Phe Pro Ala Asn Lys Pro Ser Leu Arg			
	255	260	265
caa gga tgt gag gaa gcc atc tcc cag gtg gag cca ctt ccc acc ctc			1229
Gln Gly Cys Glu Glu Ala Ile Ser Gln Val Glu Pro Leu Pro Thr Leu			
	270	275	280
atg aag gga tta aag agg aaa gag gac cag gat cgc tcc ccg agg aga			1277
Met Lys Gly Leu Lys Arg Lys Glu Asp Gln Asp Arg Ser Pro Arg Arg			
285	290	295	

cat tgc cac gag gca gca gaa gac cct gat ccc ctg tcc agg ggc gac 1325  
 His Cys His Glu Ala Ala Glu Asp Pro Asp Pro Leu Ser Arg Gly Asp  
 300 305 310

cat ccc cca gat aaa cgg cca gtc cgc ctc aac aga ccc cgg gga ggt 1373  
 His Pro Pro Asp Lys Arg Pro Val Arg Leu Asn Arg Pro Arg Gly Gly  
 315 320 325 330

act ttg ttt ggc cgg aca ata cag gag gtc ttc aaa agc aat aaa gag 1421  
 Thr Leu Phe Gly Arg Thr Ile Gln Glu Val Phe Lys Ser Asn Lys Glu  
 335 340 345

gca ggc cgc ctg ggc agc aag gaa tcc aag gag agt ggc ttt gcg gaa 1469  
 Ala Gly Arg Leu Gly Ser Lys Glu Ser Lys Glu Ser Gly Phe Ala Glu  
 350 355 360

cct ggg gaa agt gac cac gcg gcc gtc cca gga ggg agt cag tcc acc 1517  
 Pro Gly Glu Ser Asp His Ala Ala Val Pro Gly Gly Ser Gln Ser Thr  
 365 370 375

atg gta cct tcc cgc ctt cca gct gtg act aaa gag gaa gaa gaa agt 1565  
 Met Val Pro Ser Arg Leu Pro Ala Val Thr Lys Glu Glu Glu Glu Ser  
 380 385 390

aga gat gag aaa gaa gat tct ctc agg gga aag tct gtg cgc cag agt 1613  
 Arg Asp Glu Lys Glu Asp Ser Leu Arg Gly Lys Ser Val Arg Gln Ser  
 395 400 405 410

aag cga agg gaa gag tgg atc tac agc ctc ggg ggc gtg tct tct tta 1661  
 Lys Arg Arg Glu Glu Trp Ile Tyr Ser Leu Gly Gly Val Ser Ser Leu  
 415 420 425

gag ctc aca gcc atc cag tgc aag aac atc ccc gac tac ctc aac gac 1709  
 Glu Leu Thr Ala Ile Gln Cys Lys Asn Ile Pro Asp Tyr Leu Asn Asp  
 430 435 440

aga gcc atc ctg gag aaa cac ttc agc aaa atc gct aaa gtc cag cgg 1757  
 Arg Ala Ile Leu Glu Lys His Phe Ser Lys Ile Ala Lys Val Gln Arg

445	450	455	
gtc ttc acc aga cgc agc aag aag ctc gcc gtg att cat ttt ttc gac			1805
Val Phe Thr Arg Arg Ser Lys Lys Leu Ala Val Ile His Phe Phe Asp			
460	465	470	
cac gca tcg gca gcc ctg gct agg aag aag ggg aaa ggt ctg cat aag			1853
His Ala Ser Ala Ala Leu Ala Arg Lys Lys Gly Lys Gly Leu His Lys			
475	480	485	490
gac gtg gtt atc ttt tgg cac aag aag aaa ata agt ccc agc aag aaa			1901
Asp Val Val Ile Phe Trp His Lys Lys Lys Ile Ser Pro Ser Lys Lys			
495	500	505	
ctc ttt ccc ctg aag gag aag ctt ggt gag agt gaa gcc agc cag ggc			1949
Leu Phe Pro Leu Lys Glu Lys Leu Gly Glu Ser Glu Ala Ser Gln Gly			
510	515	520	
atc gag gac tcc ccc ttt cag cac tcg cct ctc agc aag ccc atc gtg			1997
Ile Glu Asp Ser Pro Phe Gln His Ser Pro Leu Ser Lys Pro Ile Val			
525	530	535	
agg cct gca gcc ggc agc ctc ctc agc aaa agc tct cca gtg aag aag			2045
Arg Pro Ala Ala Gly Ser Leu Leu Ser Lys Ser Ser Pro Val Lys Lys			
540	545	550	
ccg agt ctt ctg aag atg cac cag ttt gag gcg gat cct ttt gac tct			2093
Pro Ser Leu Leu Lys Met His Gln Phe Glu Ala Asp Pro Phe Asp Ser			
555	560	565	570
gga tct gag ggc tcc gag ggc ctt ggt tct tgc gtg tca tct ctt agc			2141
Gly Ser Glu Gly Ser Glu Gly Leu Gly Ser Cys Val Ser Ser Leu Ser			
575	580	585	
acc ctg ata ggg act gtg gca gac aca tct gag gag aag tac cgc ctt			2189
Thr Leu Ile Gly Thr Val Ala Asp Thr Ser Glu Glu Lys Tyr Arg Leu			
590	595	600	



ctg gac cag aga gac cgc atc atg cgg caa gct cga gtg aag agg acg	2237
Leu Asp Gln Arg Asp Arg Ile Met Arg Gln Ala Arg Val Lys Arg Thr	
605 610 615	
gac ctg gac aaa gcc agg gca ttt gtt ggg act tgc cct gac atg tgt	2285
Asp Leu Asp Lys Ala Arg Ala Phe Val Gly Thr Cys Pro Asp Met Cys	
620 625 630	
ccc gag aag gag cgg tac ttg agg gag acc cgg agc cag ctg agc gtg	2333
Pro Glu Lys Glu Arg Tyr Leu Arg Glu Thr Arg Ser Gln Leu Ser Val	
635 640 645 650	
ttt gaa gtt gtc cca ggg act gac cag gtg gac cat gca gca gcc gtg	2381
Phe Glu Val Val Pro Gly Thr Asp Gln Val Asp His Ala Ala Ala Val	
655 660 665	
aag gag tac agc cgg tcc tct gca gat cag gag gag ccc ctg cca cat	2429
Lys Glu Tyr Ser Arg Ser Ser Ala Asp Gln Glu Glu Pro Leu Pro His	
670 675 680	
gag ctg aga ccc tca gca gtt ctc agc agg acc atg gac tac ctg gtg	2477
Glu Leu Arg Pro Ser Ala Val Leu Ser Arg Thr Met Asp Tyr Leu Val	
685 690 695	
acc cag atc atg gac caa aag gaa ggc agc ctt cgg gat tgg tat gac	2525
Thr Gln Ile Met Asp Gln Lys Glu Gly Ser Leu Arg Asp Trp Tyr Asp	
700 705 710	
ttc gtg tgg aac cgc acc cgg ggt ata cgg aag gac ata aca cag cag	2573
Phe Val Trp Asn Arg Thr Arg Gly Ile Arg Lys Asp Ile Thr Gln Gln	
715 720 725 730	
cac ctc tgt gat ccc ctg acg gtg tct ctg atc gag aag tgt acc cga	2621
His Leu Cys Asp Pro Leu Thr Val Ser Leu Ile Glu Lys Cys Thr Arg	
735 740 745	
ttt cac att cac tgt gcc cac ttt atg tgt gag gag cct atg tct tcc	2669
Phe His Ile His Cys Ala His Phe Met Cys Glu Glu Pro Met Ser Ser	

750	755	760	
ttt gat gcc aag atc aac aat gag aac atg acc aag tgt cta cag agt			2717
Phe Asp Ala Lys Ile Asn Asn Glu Asn Met Thr Lys Cys Leu Gln Ser			
765	770	775	
ctg aag gag atg tac cag gac ctg agg aac aag ggt gtt ttt tgt gcc			2765
Leu Lys Glu Met Tyr Gln Asp Leu Arg Asn Lys Gly Val Phe Cys Ala			
780	785	790	
agt gaa gca gag ttt cag ggc tac aat gtc ctg ctt aat ctc aac aaa			2813
Ser Glu Ala Glu Phe Gln Gly Tyr Asn Val Leu Leu Asn Leu Asn Lys			
795	800	805	810
gga gac att ttg aga gaa gtg cag cag ttc cac cct gac gtt agg aac			2861
Gly Asp Ile Leu Arg Glu Val Gln Gln Phe His Pro Asp Val Arg Asn			
	815	820	825
tcc cca gag gtg aac ttc gct gtc cag gct ttt gct gca ttg aac agc			2909
Ser Pro Glu Val Asn Phe Ala Val Gln Ala Phe Ala Ala Leu Asn Ser			
	830	835	840
aat aat ttt gtg aga ttt ttc aaa ctg gtt cag tca gct tct tac ctg			2957
Asn Asn Phe Val Arg Phe Phe Lys Leu Val Gln Ser Ala Ser Tyr Leu			
	845	850	855
aat gcg tgc ctg tta cac tgt tac ttt aat cag atc cgc aag gat gcc			3005
Asn Ala Cys Leu Leu His Cys Tyr Phe Asn Gln Ile Arg Lys Asp Ala			
	860	865	870
ctc cgg gca ctc aat gtt gct tat act gta agc aca cag cgc tct acc			3053
Leu Arg Ala Leu Asn Val Ala Tyr Thr Val Ser Thr Gln Arg Ser Thr			
875	880	885	890
gtc ttc ccc ctg gat ggt gtc gtc cgc atg ctg ctg ttc aga gat agt			3101
Val Phe Pro Leu Asp Gly Val Val Arg Met Leu Leu Phe Arg Asp Ser			
	895	900	905

gaa gag gcg aca aac ttc ctc aat tac cat ggc ctc act gta gct gat 3149  
 Glu Glu Ala Thr Asn Phe Leu Asn Tyr His Gly Leu Thr Val Ala Asp  
 910 915 920

ggc tgt gtt gag ctg aat cgg tcg gca ttc ttg gaa ccg gag gga tta 3197  
 Gly Cys Val Glu Leu Asn Arg Ser Ala Phe Leu Glu Pro Glu Gly Leu  
 925 930 935

tgc aag gcc agg aag tca gtg ttt att ggc cgg aag ctg acg gtg tca 3245  
 Cys Lys Ala Arg Lys Ser Val Phe Ile Gly Arg Lys Leu Thr Val Ser  
 940 945 950

gtt ggg gaa gtt gtg aat gga ggg ccg ttg ccc cct gtt cct cgc cat 3293  
 Val Gly Glu Val Val Asn Gly Gly Pro Leu Pro Pro Val Pro Arg His  
 955 960 965 970

aca cct gtg tgc agc ttc aac tcc cag aat aag tac gtt gga gag agc 3341  
 Thr Pro Val Cys Ser Phe Asn Ser Gln Asn Lys Tyr Val Gly Glu Ser  
 975 980 985

ctg gct acg gag ctg ccc atc agc act cag aga gct ggt gga gac cca 3389  
 Leu Ala Thr Glu Leu Pro Ile Ser Thr Gln Arg Ala Gly Gly Asp Pro  
 990 995 1000

gca ggt ggt ggc aga gga gag gac tgt gag gca gag gtg gac ttg 3434  
 Ala Gly Gly Gly Arg Gly Glu Asp Cys Glu Ala Glu Val Asp Leu  
 1005 1010 1015

cca aca ttg gcg gtc ctc cca cag ccg cct cct gca tcc tca gcc 3479  
 Pro Thr Leu Ala Val Leu Pro Gln Pro Pro Pro Ala Ser Ser Ala  
 1020 1025 1030

acg ccg gcg ctt cat gtc cag cca ctg gcc cca gcc gca gca ccc 3524  
 Thr Pro Ala Leu His Val Gln Pro Leu Ala Pro Ala Ala Pro  
 1035 1040 1045

agc ctt ctc cag gcc tcc acg cag cct gag gtg ctg ctt cca aag 3569  
 Ser Leu Leu Gln Ala Ser Thr Gln Pro Glu Val Leu Leu Pro Lys

1050	1055	1060	
cct gcg cct	gtg tac tct gac tcg	gac ctg gta cag gtg	gtg gac 3614
Pro Ala Pro	Val Tyr Ser Asp Ser	Asp Leu Val Gln Val	Val Asp
1065	1070	1075	
gag ctc atc	cag gag gct ctg caa	gtg gac tgt gag gaa	gtc agc 3659
Glu Leu Ile	Gln Glu Ala Leu Gln	Val Asp Cys Glu Glu	Val Ser
1080	1085	1090	
tcc gct ggg	gca gcc tac gta gcc	gca gct ctg ggc gtt	tcc aat 3704
Ser Ala Gly	Ala Ala Tyr Val Ala	Ala Ala Leu Gly Val	Ser Asn
1095	1100	1105	
gct gct gtg	gag gat ctg att act	gct gcg acc acg ggc	att ctg 3749
Ala Ala Val	Glu Asp Leu Ile Thr	Ala Ala Thr Thr Gly	Ile Leu
1110	1115	1120	
agg cac gtt	gcc gct gag gaa gtt	tcc atg gaa agg cag	aga cta 3794
Arg His Val	Ala Ala Glu Glu Val	Ser Met Glu Arg Gln	Arg Leu
1125	1130	1135	
gag gaa gag	aag caa cga gct gag	gag gaa cgg ttg aag	caa gag 3839
Glu Glu Glu	Lys Gln Arg Ala Glu	Glu Glu Arg Leu Lys	Gln Glu
1140	1145	1150	
aga gaa ctg	atg tta act cag ctg	agc gag ggt ctg gcc	gca gag 3884
Arg Glu Leu	Met Leu Thr Gln Leu	Ser Glu Gly Leu Ala	Ala Glu
1155	1160	1165	
ctg aca gaa	ctc acg gtg aca gag	tgt gtg tgg gaa acc	tgc tct 3929
Leu Thr Glu	Leu Thr Val Thr Glu	Cys Val Trp Glu Thr	Cys Ser
1170	1175	1180	
cag gag cta	cag agt gca gta aaa	ata gac cag aag gtc	cgt gtg 3974
Gln Glu Leu	Gln Ser Ala Val Lys	Ile Asp Gln Lys Val	Arg Val
1185	1190	1195	

gcc cgc tgt	tgt gaa gcc gtc tgt	gca cac ctg gtg gat	ttg ttt	4019
Ala Arg Cys	Cys Glu Ala Val Cys	Ala His Leu Val Asp	Leu Phe	
1200	1205	1210		
ctt gct gag	gaa att ttc cag act	gca aaa gag aca ctc	cag gaa	4064
Leu Ala Glu	Glu Ile Phe Gln Thr	Ala Lys Glu Thr Leu	Gln Glu	
1215	1220	1225		
ctc cag tgt	ttc tgc aag tat cta	caa cgg tgg agg gag	gct gtt	4109
Leu Gln Cys	Phe Cys Lys Tyr Leu	Gln Arg Trp Arg Glu	Ala Val	
1230	1235	1240		
gca gct cgg	aag aaa ttc cgg cgt	cag atg cgg gcc ttc	cct gca	4154
Ala Ala Arg	Lys Lys Phe Arg Arg	Gln Met Arg Ala Phe	Pro Ala	
1245	1250	1255		
gcg cca tgc	tgt gtg gat gtg aat	gac cgg ctg cag gca	cta gtg	4199
Ala Pro Cys	Cys Val Asp Val Asn	Asp Arg Leu Gln Ala	Leu Val	
1260	1265	1270		
ccc agc gca	gag tgc ccc att act	gag gag aac ctg gcc	aag ggt	4244
Pro Ser Ala	Glu Cys Pro Ile Thr	Glu Glu Asn Leu Ala	Lys Gly	
1275	1280	1285		
ctt ttg gac	ctg ggc cac gca ggc	aaa gta ggc gtc tcc	tgt acc	4289
Leu Leu Asp	Leu Gly His Ala Gly	Lys Val Gly Val Ser	Cys Thr	
1290	1295	1300		
agg ttg agg	cgg ctt aga aac aag	aca gct cac cag ata	aag gtc	4334
Arg Leu Arg	Arg Leu Arg Asn Lys	Thr Ala His Gln Ile	Lys Val	
1305	1310	1315		
cag cac ttc	cac cag cag ctg ctg	agg aat gct gca tgg	gca cct	4379
Gln His Phe	His Gln Gln Leu Leu	Arg Asn Ala Ala Trp	Ala Pro	
1320	1325	1330		
ctg gac ctg	cca tcc att gtg tct	gag cac ctc ccc atg	aag cag	4424
Leu Asp Leu	Pro Ser Ile Val Ser	Glu His Leu Pro Met	Lys Gln	



1335	1340	1345	
aag cga agg ttt tgg aaa ctg gtg ctg gtg ttg cct gat gtg gaa			4469
Lys Arg Arg Phe Trp Lys Leu Val Leu Val Leu Pro Asp Val Glu			
1350	1355	1360	
gag cag act cca gag agt cct ggc aga ata cta gaa aac tgg cta			4514
Glu Gln Thr Pro Glu Ser Pro Gly Arg Ile Leu Glu Asn Trp Leu			
1365	1370	1375	
aag gtc aaa ttc aca gga gat gac agc atg gtg ggt gac ata gga			4559
Lys Val Lys Phe Thr Gly Asp Asp Ser Met Val Gly Asp Ile Gly			
1380	1385	1390	
gat aat gct ggt gat atc cag acc ctc tca gtc ttt aat aca ctt			4604
Asp Asn Ala Gly Asp Ile Gln Thr Leu Ser Val Phe Asn Thr Leu			
1395	1400	1405	
agt agt aaa ggg gat caa aca gtt tct gtc aac gtg tgt ata aag			4649
Ser Ser Lys Gly Asp Gln Thr Val Ser Val Asn Val Cys Ile Lys			
1410	1415	1420	
gtg gct cat ggc acc ctt agt gac agt gcc ctt gat gct gtg gag			4694
Val Ala His Gly Thr Leu Ser Asp Ser Ala Leu Asp Ala Val Glu			
1425	1430	1435	
acc cag aag gac ctg ttg gga acc agt ggg ctc atg ctg ctg ctt			4739
Thr Gln Lys Asp Leu Leu Gly Thr Ser Gly Leu Met Leu Leu Leu			
1440	1445	1450	
ccc ccg aaa gtg aag agt gag gag gtg gca gag gag gaa ctg tcc			4784
Pro Pro Lys Val Lys Ser Glu Glu Val Ala Glu Glu Glu Leu Ser			
1455	1460	1465	
tgg ctg tcg gct tta ctg cag ctc aag cag ctt ctg cag gcc aag			4829
Trp Leu Ser Ala Leu Leu Gln Leu Lys Gln Leu Leu Gln Ala Lys			
1470	1475	1480	

ccc ttc cag	cct gcc ctg ccg ctg	gtg gtc ctc gtg ccc	agc tcc	4874
Pro Phe Gln	Pro Ala Leu Pro Leu	Val Val Leu Val Pro	Ser Ser	
1485	1490	1495		
aga ggg gac	tcc gcg ggg agg gca	gta gag gac ggt ctg	atg tta	4919
Arg Gly Asp	Ser Ala Gly Arg Ala	Val Glu Asp Gly Leu	Met Leu	
1500	1505	1510		
cag gat ttg	gtt tca gcc aag ctg	att tcc gat tac att	gtt gtt	4964
Gln Asp Leu	Val Ser Ala Lys Leu	Ile Ser Asp Tyr Ile	Val Val	
1515	1520	1525		
gag att cct	gac tct gtt aat gat	tta caa ggc aca gtg	aag gtt	5009
Glu Ile Pro	Asp Ser Val Asn Asp	Leu Gln Gly Thr Val	Lys Val	
1530	1535	1540		
tct gga gca	gtc cag tgg ctg atc	tcc gga tgt cct caa	gcc cta	5054
Ser Gly Ala	Val Gln Trp Leu Ile	Ser Gly Cys Pro Gln	Ala Leu	
1545	1550	1555		
gac ctt tgc	tgc cag acc ctt gtt	cag tat gtt gag gat	ggg atc	5099
Asp Leu Cys	Cys Gln Thr Leu Val	Gln Tyr Val Glu Asp	Gly Ile	
1560	1565	1570		
agc cgc gag	ttc agc cgt cgg ttt	ttc cac gac agg aga	gag agg	5144
Ser Arg Glu	Phe Ser Arg Arg Phe	Phe His Asp Arg Arg	Glu Arg	
1575	1580	1585		
cgc ctg gct	agc ctg ccc tcc cag	gag cct agc acc att	att gag	5189
Arg Leu Ala	Ser Leu Pro Ser Gln	Glu Pro Ser Thr Ile	Ile Glu	
1590	1595	1600		
ttg ttc aac	agt gtg ctg cag ttc	ctg gcc tct gtg gta	tcc tct	5234
Leu Phe Asn	Ser Val Leu Gln Phe	Leu Ala Ser Val Val	Ser Ser	
1605	1610	1615		
gag cag ctg	tgt gac atc tcc tgg	cct gtc atg gaa ttt	gcc gaa	5279
Glu Gln Leu	Cys Asp Ile Ser Trp	Pro Val Met Glu Phe	Ala Glu	

1620	1625	1630	
gtg gga ggc agc cag ctg ctt cct cac ctg cac tgg aac tca cca			5324
Val Gly Gly Ser Gln Leu Leu Pro His Leu His Trp Asn Ser Pro			
1635	1640	1645	
gag cat cta gcg tgg ctg aaa caa gct gtg ctt ggg ttc cag ctt			5369
Glu His Leu Ala Trp Leu Lys Gln Ala Val Leu Gly Phe Gln Leu			
1650	1655	1660	
cca cag atg gac ctt cca ccc cca ggg gcc ccc tgg ctc cct gtg			5414
Pro Gln Met Asp Leu Pro Pro Pro Gly Ala Pro Trp Leu Pro Val			
1665	1670	1675	
tgt tcc atg gtc att cag tac acc tcc cag att ccc agc tca agc			5459
Cys Ser Met Val Ile Gln Tyr Thr Ser Gln Ile Pro Ser Ser Ser			
1680	1685	1690	
cag aca cag cct gtc ctc cag tcc cag gcg gag aac ctg ctg tgc			5504
Gln Thr Gln Pro Val Leu Gln Ser Gln Ala Glu Asn Leu Leu Cys			
1695	1700	1705	
aga aca tac cag aag tgg aag aac aag agc ctc tct cca ggc cag			5549
Arg Thr Tyr Gln Lys Trp Lys Asn Lys Ser Leu Ser Pro Gly Gln			
1710	1715	1720	
gag ttg ggg cct tct gtt gcc gag atc ccg tgg gat gac atc atc			5594
Glu Leu Gly Pro Ser Val Ala Glu Ile Pro Trp Asp Asp Ile Ile			
1725	1730	1735	
acc tta tgc atc aat cat aag ctg agg gac tgg aca ccc ccc agg			5639
Thr Leu Cys Ile Asn His Lys Leu Arg Asp Trp Thr Pro Pro Arg			
1740	1745	1750	
ctc cct gtc aca tta gag gcg ctg agt gaa gat ggt caa ata tgt			5684
Leu Pro Val Thr Leu Glu Ala Leu Ser Glu Asp Gly Gln Ile Cys			
1755	1760	1765	

gtg tat ttt ttc aaa aac ctt tta	aga aaa tac cac gtt ccc tcg	5729
Val Tyr Phe Phe Lys Asn Leu Leu	Arg Lys Tyr His Val Pro Ser	
1770	1775	1780
tca tgg gaa cag gcc aga atg cag	acg cag cgg gaa ctg cag ctg	5774
Ser Trp Glu Gln Ala Arg Met Gln	Thr Gln Arg Glu Leu Gln Leu	
1785	1790	1795
agt cat gga cgt tcg ggg atg agg	tcc atc cat cct cct aca agc	5819
Ser His Gly Arg Ser Gly Met Arg	Ser Ile His Pro Pro Thr Ser	
1800	1805	1810
act ttt cct act cca ttg ctt cat	gta cac cag aaa ggg aag aaa	5864
Thr Phe Pro Thr Pro Leu Leu His	Val His Gln Lys Gly Lys Lys	
1815	1820	1825
aag gaa gag agt ggc cga gag ggg	agc ctc agt aca gag gac ctc	5909
Lys Glu Glu Ser Gly Arg Glu Gly	Ser Leu Ser Thr Glu Asp Leu	
1830	1835	1840
ctg cgg ggg gct tct gca gaa gag	ctc ctg gca cag agt ctg tcc	5954
Leu Arg Gly Ala Ser Ala Glu Glu	Leu Leu Ala Gln Ser Leu Ser	
1845	1850	1855
agc agt ctt ctg gaa gag aag gaa	gag aac aag agg ttt gaa gat	5999
Ser Ser Leu Leu Glu Glu Lys Glu	Glu Asn Lys Arg Phe Glu Asp	
1860	1865	1870
caa ctt cag cag tgg tta tcg caa	gac tca cag gca ttc aca gag	6044
Gln Leu Gln Gln Trp Leu Ser Gln	Asp Ser Gln Ala Phe Thr Glu	
1875	1880	1885
tca act cgg ctt cct ctc tac ctc	cct cag acg cta gtg tcc ttt	6089
Ser Thr Arg Leu Pro Leu Tyr Leu	Pro Gln Thr Leu Val Ser Phe	
1890	1895	1900
cct gat tct atc aaa act cag acc	atg gtg aaa aca tct aca agt	6134
Pro Asp Ser Ile Lys Thr Gln Thr	Met Val Lys Thr Ser Thr Ser	

Val Ser Ser Ser Thr Thr Gly Thr Tyr Gln Thr Lys Ser Pro Phe Arg  
20 25 30



Phe Gly Gln Pro Ser Leu Phe Gly Gln Asn Ser Thr Pro Ser Lys Ser  
35 40 45

Leu Ala Phe Ser Gln Val Pro Ser Phe Ala Thr Pro Ser Gly Gly Ser  
50 55 60

His Ser Ser Ser Leu Pro Ala Phe Gly Leu Thr Gln Thr Ser Ser Val  
65 70 75 80

Gly Leu Phe Ser Ser Leu Glu Ser Thr Pro Ser Phe Ala Ala Thr Ser  
85 90 95

Ser Ser Ser Val Pro Gly Asn Thr Ala Phe Ser Phe Lys Ser Thr Ser  
100 105 110

Ser Val Gly Val Phe Pro Ser Gly Ala Thr Phe Gly Pro Glu Thr Gly  
115 120 125

Glu Val Ala Gly Ser Gly Phe Arg Lys Thr Glu Phe Lys Phe Lys Pro  
130 135 140

Leu Glu Asn Ala Val Phe Lys Pro Ile Pro Gly Pro Glu Ser Glu Pro  
145 150 155 160

Glu Lys Thr Gln Ser Gln Ile Ser Ser Gly Phe Phe Thr Phe Ser His  
165 170 175

Pro Val Gly Ser Gly Ser Gly Gly Leu Thr Pro Phe Ser Phe Pro Gln  
180 185 190

Val Thr Asn Ser Ser Val Thr Ser Ser Ser Phe Ile Phe Ser Lys Pro  
195 200 205

Val Thr Ser Asn Thr Pro Ala Phe Ala Ser Pro Leu Ser Asn Gln Asn  
210 215 220

Val Glu Glu Glu Lys Arg Val Ser Thr Ser Ala Phe Gly Ser Ser Asn  
225 230 235 240

Ser Ser Phe Ser Thr Phe Pro Thr Ala Ser Pro Gly Ser Leu Gly Glu  
245 250 255

Pro Phe Pro Ala Asn Lys Pro Ser Leu Arg Gln Gly Cys Glu Glu Ala  
260 265 270

Ile Ser Gln Val Glu Pro Leu Pro Thr Leu Met Lys Gly Leu Lys Arg  
275 280 285

Lys Glu Asp Gln Asp Arg Ser Pro Arg Arg His Cys His Glu Ala Ala  
290 295 300

Glu Asp Pro Asp Pro Leu Ser Arg Gly Asp His Pro Pro Asp Lys Arg  
305 310 315 320

Pro Val Arg Leu Asn Arg Pro Arg Gly Gly Thr Leu Phe Gly Arg Thr  
325 330 335

Ile Gln Glu Val Phe Lys Ser Asn Lys Glu Ala Gly Arg Leu Gly Ser  
340 345 350

Lys Glu Ser Lys Glu Ser Gly Phe Ala Glu Pro Gly Glu Ser Asp His  
355 360 365

Ala Ala Val Pro Gly Gly Ser Gln Ser Thr Met Val Pro Ser Arg Leu  
370 375 380

Pro Ala Val Thr Lys Glu Glu Glu Glu Ser Arg Asp Glu Lys Glu Asp  
385 390 395 400

Ser Leu Arg Gly Lys Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg Arg Glu Glu Trp  
405 410 415

Ile Tyr Ser Leu Gly Gly Val Ser Ser Leu Glu Leu Thr Ala Ile Gln  
420 425 430

Cys Lys Asn Ile Pro Asp Tyr Leu Asn Asp Arg Ala Ile Leu Glu Lys  
435 440 445

His Phe Ser Lys Ile Ala Lys Val Gln Arg Val Phe Thr Arg Arg Ser  
450 455 460

Lys Lys Leu Ala Val Ile His Phe Phe Asp His Ala Ser Ala Ala Leu  
465 470 475 480

Ala Arg Lys Lys Gly Lys Gly Leu His Lys Asp Val Val Ile Phe Trp  
485 490 495

His Lys Lys Lys Ile Ser Pro Ser Lys Lys Leu Phe Pro Leu Lys Glu  
500 505 510

Lys Leu Gly Glu Ser Glu Ala Ser Gln Gly Ile Glu Asp Ser Pro Phe  
515 520 525

Gln His Ser Pro Leu Ser Lys Pro Ile Val Arg Pro Ala Ala Gly Ser  
530 535 540

Leu Leu Ser Lys Ser Ser Pro Val Lys Lys Pro Ser Leu Leu Lys Met  
545 550 555 560

His Gln Phe Glu Ala Asp Pro Phe Asp Ser Gly Ser Glu Gly Ser Glu  
565 570 575

Gly Leu Gly Ser Cys Val Ser Ser Leu Ser Thr Leu Ile Gly Thr Val  
580 585 590

Ala Asp Thr Ser Glu Glu Lys Tyr Arg Leu Leu Asp Gln Arg Asp Arg  
595 600 605

Ile Met Arg Gln Ala Arg Val Lys Arg Thr Asp Leu Asp Lys Ala Arg  
610 615 620

Ala Phe Val Gly Thr Cys Pro Asp Met Cys Pro Glu Lys Glu Arg Tyr  
625 630 635 640

Leu Arg Glu Thr Arg Ser Gln Leu Ser Val Phe Glu Val Val Pro Gly  
645 650 655

Thr Asp Gln Val Asp His Ala Ala Ala Val Lys Glu Tyr Ser Arg Ser  
660 665 670

Ser Ala Asp Gln Glu Glu Pro Leu Pro His Glu Leu Arg Pro Ser Ala  
675 680 685

Val Leu Ser Arg Thr Met Asp Tyr Leu Val Thr Gln Ile Met Asp Gln  
690 695 700

Lys Glu Gly Ser Leu Arg Asp Trp Tyr Asp Phe Val Trp Asn Arg Thr  
705 710 715 720

Arg Gly Ile Arg Lys Asp Ile Thr Gln Gln His Leu Cys Asp Pro Leu  
725 730 735

Thr Val Ser Leu Ile Glu Lys Cys Thr Arg Phe His Ile His Cys Ala  
740 745 750

His Phe Met Cys Glu Glu Pro Met Ser Ser Phe Asp Ala Lys Ile Asn  
755 760 765

Asn Glu Asn Met Thr Lys Cys Leu Gln Ser Leu Lys Glu Met Tyr Gln  
770 775 780

Asp Leu Arg Asn Lys Gly Val Phe Cys Ala Ser Glu Ala Glu Phe Gln  
785 790 795 800



Gly Tyr Asn Val Leu Leu Asn Leu Asn Lys Gly Asp Ile Leu Arg Glu  
805 810 815

Val Gln Gln Phe His Pro Asp Val Arg Asn Ser Pro Glu Val Asn Phe  
820 825 830

Ala Val Gln Ala Phe Ala Ala Leu Asn Ser Asn Asn Phe Val Arg Phe  
835 840 845

Phe Lys Leu Val Gln Ser Ala Ser Tyr Leu Asn Ala Cys Leu Leu His  
850 855 860

Cys Tyr Phe Asn Gln Ile Arg Lys Asp Ala Leu Arg Ala Leu Asn Val  
865 870 875 880

Ala Tyr Thr Val Ser Thr Gln Arg Ser Thr Val Phe Pro Leu Asp Gly  
885 890 895

Val Val Arg Met Leu Leu Phe Arg Asp Ser Glu Glu Ala Thr Asn Phe  
900 905 910

Leu Asn Tyr His Gly Leu Thr Val Ala Asp Gly Cys Val Glu Leu Asn  
915 920 925

Arg Ser Ala Phe Leu Glu Pro Glu Gly Leu Cys Lys Ala Arg Lys Ser  
930 935 940

Val Phe Ile Gly Arg Lys Leu Thr Val Ser Val Gly Glu Val Val Asn  
945 950 955 960

Gly Gly Pro Leu Pro Pro Val Pro Arg His Thr Pro Val Cys Ser Phe  
965 970 975

Asn Ser Gln Asn Lys Tyr Val Gly Glu Ser Leu Ala Thr Glu Leu Pro  
980 985 990

Ile Ser Thr Gln Arg Ala Gly Gly Asp Pro Ala Gly Gly Gly Arg Gly  
995 1000 1005

Glu Asp Cys Glu Ala Glu Val Asp Leu Pro Thr Leu Ala Val Leu  
1010 1015 1020

Pro Gln Pro Pro Pro Ala Ser Ser Ala Thr Pro Ala Leu His Val  
1025 1030 1035

Gln Pro Leu Ala Pro Ala Ala Ala Pro Ser Leu Leu Gln Ala Ser  
1040 1045 1050

Thr Gln Pro Glu Val Leu Leu Pro Lys Pro Ala Pro Val Tyr Ser  
1055 1060 1065

Asp Ser Asp Leu Val Gln Val Val Asp Glu Leu Ile Gln Glu Ala  
1070 1075 1080

Leu Gln Val Asp Cys Glu Glu Val Ser Ser Ala Gly Ala Ala Tyr  
1085 1090 1095

Val Ala Ala Ala Leu Gly Val Ser Asn Ala Ala Val Glu Asp Leu  
1100 1105 1110

Ile Thr Ala Ala Thr Thr Gly Ile Leu Arg His Val Ala Ala Glu  
1115 1120 1125

Glu Val Ser Met Glu Arg Gln Arg Leu Glu Glu Glu Lys Gln Arg  
1130 1135 1140

Ala Glu Glu Glu Arg Leu Lys Gln Glu Arg Glu Leu Met Leu Thr  
1145 1150 1155

Gln Leu Ser Glu Gly Leu Ala Ala Glu Leu Thr Glu Leu Thr Val  
1160 1165 1170

Thr Glu Cys Val Trp Glu Thr Cys Ser Gln Glu Leu Gln Ser Ala  
1175 1180 1185

Val Lys Ile Asp Gln Lys Val Arg Val Ala Arg Cys Cys Glu Ala  
1190 1195 1200

Val Cys Ala His Leu Val Asp Leu Phe Leu Ala Glu Glu Ile Phe  
1205 1210 1215

Gln Thr Ala Lys Glu Thr Leu Gln Glu Leu Gln Cys Phe Cys Lys  
1220 1225 1230

Tyr Leu Gln Arg Trp Arg Glu Ala Val Ala Ala Arg Lys Lys Phe  
1235 1240 1245

Arg Arg Gln Met Arg Ala Phe Pro Ala Ala Pro Cys Cys Val Asp  
1250 1255 1260

Val Asn Asp Arg Leu Gln Ala Leu Val Pro Ser Ala Glu Cys Pro  
1265 1270 1275

Ile Thr Glu Glu Asn Leu Ala Lys Gly Leu Leu Asp Leu Gly His  
1280 1285 1290

Ala Gly Lys Val Gly Val Ser Cys Thr Arg Leu Arg Arg Leu Arg  
1295 1300 1305

Asn Lys Thr Ala His Gln Ile Lys Val Gln His Phe His Gln Gln  
1310 1315 1320

Leu Leu Arg Asn Ala Ala Trp Ala Pro Leu Asp Leu Pro Ser Ile  
1325 1330 1335

Val Ser Glu His Leu Pro Met Lys Gln Lys Arg Arg Phe Trp Lys  
1340 1345 1350

Leu Val Leu Val Leu Pro Asp Val Glu Glu Gln Thr Pro Glu Ser  
1355 1360 1365

Pro Gly Arg Ile Leu Glu Asn Trp Leu Lys Val Lys Phe Thr Gly  
1370 1375 1380

Asp Asp Ser Met Val Gly Asp Ile Gly Asp Asn Ala Gly Asp Ile  
1385 1390 1395

Gln Thr Leu Ser Val Phe Asn Thr Leu Ser Ser Lys Gly Asp Gln  
1400 1405 1410

Thr Val Ser Val Asn Val Cys Ile Lys Val Ala His Gly Thr Leu  
1415 1420 1425

Ser Asp Ser Ala Leu Asp Ala Val Glu Thr Gln Lys Asp Leu Leu  
1430 1435 1440

Gly Thr Ser Gly Leu Met Leu Leu Leu Pro Pro Lys Val Lys Ser  
1445 1450 1455

Glu Glu Val Ala Glu Glu Glu Leu Ser Trp Leu Ser Ala Leu Leu  
1460 1465 1470

Gln Leu Lys Gln Leu Leu Gln Ala Lys Pro Phe Gln Pro Ala Leu  
1475 1480 1485

Pro Leu Val Val Leu Val Pro Ser Ser Arg Gly Asp Ser Ala Gly  
1490 1495 1500

Arg Ala Val Glu Asp Gly Leu Met Leu Gln Asp Leu Val Ser Ala  
1505 1510 1515



Lys Leu Ile Ser Asp Tyr Ile Val Val Glu Ile Pro Asp Ser Val  
1520 1525 1530

Asn Asp Leu Gln Gly Thr Val Lys Val Ser Gly Ala Val Gln Trp  
1535 1540 1545

Leu Ile Ser Gly Cys Pro Gln Ala Leu Asp Leu Cys Cys Gln Thr  
1550 1555 1560

Leu Val Gln Tyr Val Glu Asp Gly Ile Ser Arg Glu Phe Ser Arg  
1565 1570 1575

Arg Phe Phe His Asp Arg Arg Glu Arg Arg Leu Ala Ser Leu Pro  
1580 1585 1590

Ser Gln Glu Pro Ser Thr Ile Ile Glu Leu Phe Asn Ser Val Leu  
1595 1600 1605

Gln Phe Leu Ala Ser Val Val Ser Ser Glu Gln Leu Cys Asp Ile  
1610 1615 1620

Ser Trp Pro Val Met Glu Phe Ala Glu Val Gly Gly Ser Gln Leu  
1625 1630 1635

Leu Pro His Leu His Trp Asn Ser Pro Glu His Leu Ala Trp Leu  
1640 1645 1650

Lys Gln Ala Val Leu Gly Phe Gln Leu Pro Gln Met Asp Leu Pro  
1655 1660 1665

Pro Pro Gly Ala Pro Trp Leu Pro Val Cys Ser Met Val Ile Gln  
1670 1675 1680

Tyr Thr Ser Gln Ile Pro Ser Ser Ser Gln Thr Gln Pro Val Leu  
1685 1690 1695

Gln Ser Gln Ala Glu Asn Leu Leu Cys Arg Thr Tyr Gln Lys Trp  
1700 1705 1710

Lys Asn Lys Ser Leu Ser Pro Gly Gln Glu Leu Gly Pro Ser Val  
1715 1720 1725

Ala Glu Ile Pro Trp Asp Asp Ile Ile Thr Leu Cys Ile Asn His  
1730 1735 1740

Lys Leu Arg Asp Trp Thr Pro Pro Arg Leu Pro Val Thr Leu Glu  
1745 1750 1755

Ala Leu Ser Glu Asp Gly Gln Ile Cys Val Tyr Phe Phe Lys Asn  
1760 1765 1770

Leu Leu Arg Lys Tyr His Val Pro Ser Ser Trp Glu Gln Ala Arg  
1775 1780 1785

Met Gln Thr Gln Arg Glu Leu Gln Leu Ser His Gly Arg Ser Gly  
1790 1795 1800

Met Arg Ser Ile His Pro Pro Thr Ser Thr Phe Pro Thr Pro Leu  
1805 1810 1815

Leu His Val His Gln Lys Gly Lys Lys Lys Glu Glu Ser Gly Arg  
1820 1825 1830

Glu Gly Ser Leu Ser Thr Glu Asp Leu Leu Arg Gly Ala Ser Ala  
1835 1840 1845

Glu Glu Leu Leu Ala Gln Ser Leu Ser Ser Ser Leu Leu Glu Glu  
1850 1855 1860

Lys Glu Glu Asn Lys Arg Phe Glu Asp Gln Leu Gln Gln Trp Leu  
1865 1870 1875

Ser Gln Asp Ser Gln Ala Phe Thr Glu Ser Thr Arg Leu Pro Leu  
1880 1885 1890

Tyr Leu Pro Gln Thr Leu Val Ser Phe Pro Asp Ser Ile Lys Thr  
1895 1900 1905

Gln Thr Met Val Lys Thr Ser Thr Ser Pro Gln Asn Ser Gly Thr  
1910 1915 1920

Gly Lys Gln Leu Arg Phe Ser Glu Ala Ser Gly Ser Ser Leu Thr  
1925 1930 1935

Glu Lys Leu Lys Leu Leu Glu Arg Leu Ile Gln Ser Ser Arg Ala  
1940 1945 1950

Glu Glu Ala Ala Ser Glu Leu His Leu Ser Ala Leu Leu Glu Met  
 1955 1960 1965

Val Asp Met  
 1970

<210> 3  
 <211> 6114  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (38).. (5977)

<400> 3  
 gtaataactta attaccttct aataattgga gcagaag atg aac cca act aat cct 55  
 Met Asn Pro Thr Asn Pro  
 1 5

ttc agt ggg cag cag cct agt gct ttt tcg gcg tct tct agt aat gta 103  
 Phe Ser Gly Gln Gln Pro Ser Ala Phe Ser Ala Ser Ser Ser Asn Val  
 10 15 20

gga aca ctt cca tct aag ccg cca ttt cga ttt ggt caa cct tct ctt 151  
 Gly Thr Leu Pro Ser Lys Pro Pro Phe Arg Phe Gly Gln Pro Ser Leu  
 25 30 35

ttt gga caa aac agt acc tta tct ggg aag agc tcg gga ttt tca cag 199  
 Phe Gly Gln Asn Ser Thr Leu Ser Gly Lys Ser Ser Gly Phe Ser Gln  
 40 45 50

gta tcc agc ttt cca gcg tct tct gga gta agt cat tcc tct tca gtg 247

Val	Ser	Ser	Phe	Pro	Ala	Ser	Ser	Gly	Val	Ser	His	Ser	Ser	Ser	Val	
55					60					65					70	
caa	aca	tta	ggg	ttc	acc	caa	acc	tca	agt	gtt	gga	ccc	ttt	tct	gga	295
Gln	Thr	Leu	Gly	Phe	Thr	Gln	Thr	Ser	Ser	Val	Gly	Pro	Phe	Ser	Gly	
				75					80					85		
ctt	gag	cac	act	tcc	acc	ttt	gtg	gct	acc	tct	ggg	cct	tca	agt	tca	343
Leu	Glu	His	Thr	Ser	Thr	Phe	Val	Ala	Thr	Ser	Gly	Pro	Ser	Ser	Ser	
			90					95					100			
tct	gtg	ctg	gga	aac	aca	gga	ttt	agt	ttt	aaa	tca	ccc	acc	agt	gtt	391
Ser	Val	Leu	Gly	Asn	Thr	Gly	Phe	Ser	Phe	Lys	Ser	Pro	Thr	Ser	Val	
		105					110					115				
ggg	gct	ttc	cca	agc	act	tct	gct	ttt	gga	caa	gaa	gct	gga	gaa	ata	439
Gly	Ala	Phe	Pro	Ser	Thr	Ser	Ala	Phe	Gly	Gln	Glu	Ala	Gly	Glu	Ile	
	120						125				130					
gtg	aac	tct	ggt	ttt	ggg	aaa	aca	gaa	ttc	agc	ttt	aaa	cct	ctg	gaa	487
Val	Asn	Ser	Gly	Phe	Gly	Lys	Thr	Glu	Phe	Ser	Phe	Lys	Pro	Leu	Glu	
135					140					145					150	
aat	gca	gtg	ttc	aaa	cca	ata	ctg	ggg	gct	gaa	tct	gag	cca	gag	aaa	535
Asn	Ala	Val	Phe	Lys	Pro	Ile	Leu	Gly	Ala	Glu	Ser	Glu	Pro	Glu	Lys	
				155					160					165		
acc	cag	agc	caa	att	gct	tct	ggg	ttt	ttt	aca	ttt	tcc	cac	cca	att	583
Thr	Gln	Ser	Gln	Ile	Ala	Ser	Gly	Phe	Phe	Thr	Phe	Ser	His	Pro	Ile	
			170					175					180			
agt	agt	gca	cct	gga	ggc	ctg	gcc	cct	ttc	tct	ttt	cct	caa	gta	aca	631
Ser	Ser	Ala	Pro	Gly	Gly	Leu	Ala	Pro	Phe	Ser	Phe	Pro	Gln	Val	Thr	
		185					190					195				
agt	agt	tca	gct	acc	act	tca	aat	ttt	acc	ttt	tca	aaa	cct	gtt	agt	679
Ser	Ser	Ser	Ala	Thr	Thr	Ser	Asn	Phe	Thr	Phe	Ser	Lys	Pro	Val	Ser	
	200						205				210					



31/64

Glu	Ala	Lys	Lys	Glu	Thr	Gly	Phe	Val	Glu	Ser	Ala	Glu	Ser	Asp	His		
360						365					370						
atg	gct	atc	cca	gga	ggg	aat	cag	tct	gtc	ctg	gca	cct	tcc	cgg	att	1207	
Met	Ala	Ile	Pro	Gly	Gly	Asn	Gln	Ser	Val	Leu	Ala	Pro	Ser	Arg	Ile		
375				380						385					390		
cca	ggt	gtg	aat	aaa	gag	gaa	gaa	act	gaa	agt	aga	gag	aag	aaa	gaa	1255	
Pro	Gly	Val	Asn	Lys	Glu	Glu	Glu	Thr	Glu	Ser	Arg	Glu	Lys	Lys	Glu		
			395					400						405			
gat	tct	cta	aga	gga	act	ccg	gcg	cgt	cag	agt	aac	aga	agc	gag	agc	1303	
Asp	Ser	Leu	Arg	Gly	Thr	Pro	Ala	Arg	Gln	Ser	Asn	Arg	Ser	Glu	Ser		
		410						415					420				
aca	gac	agt	ctt	ggg	ggc	ttg	tct	ccc	tct	gaa	gtc	aca	gcc	atc	cag	1351	
Thr	Asp	Ser	Leu	Gly	Gly	Leu	Ser	Pro	Ser	Glu	Val	Thr	Ala	Ile	Gln		
	425					430						435					
tgc	aag	aac	atc	cct	gac	tac	ctc	aac	gac	agg	acc	att	ctg	gag	aac	1399	
Cys	Lys	Asn	Ile	Pro	Asp	Tyr	Leu	Asn	Asp	Arg	Thr	Ile	Leu	Glu	Asn		
440						445					450						
cat	ttt	ggc	aaa	att	gct	aaa	gtg	cag	cgc	atc	ttt	acc	agg	cgc	agc	1447	
His	Phe	Gly	Lys	Ile	Ala	Lys	Val	Gln	Arg	Ile	Phe	Thr	Arg	Arg	Ser		
455				460					465						470		
aaa	aag	ctt	gca	gtg	gta	cat	ttc	ttt	gat	cat	gca	tct	gca	gcc	ctg	1495	
Lys	Lys	Leu	Ala	Val	Val	His	Phe	Phe	Asp	His	Ala	Ser	Ala	Ala	Leu		
			475					480						485			
gct	aga	aag	aag	ggg	aaa	agt	ttg	cat	aaa	gac	atg	gct	atc	ttt	tgg	1543	
Ala	Arg	Lys	Lys	Gly	Lys	Ser	Leu	His	Lys	Asp	Met	Ala	Ile	Phe	Trp		
		490					495						500				
cac	agg	aag	aaa	ata	agc	ccc	aat	aag	aaa	ccc	ttt	tcc	ctg	aag	gag	1591	
His	Arg	Lys	Lys	Ile	Ser	Pro	Asn	Lys	Lys	Pro	Phe	Ser	Leu	Lys	Glu		
	505						510					515					

aag aaa cca ggt gac ggt gaa gtc agc ccg agc aca gag gat gca ccc	1639
Lys Lys Pro Gly Asp Gly Glu Val Ser Pro Ser Thr Glu Asp Ala Pro	
520 525 530	
ttt cag cac tct cct ctt ggc aag gcc gca ggg agg act ggt gct agc	1687
Phe Gln His Ser Pro Leu Gly Lys Ala Ala Gly Arg Thr Gly Ala Ser	
535 540 545 550	
agc ctc ctg aat aaa agc tct cca gtg aag aag cca agt ctt cta aag	1735
Ser Leu Leu Asn Lys Ser Ser Pro Val Lys Lys Pro Ser Leu Leu Lys	
555 560 565	
gcc cac caa ttc gag gga gac tct ttt gac tca gcc tcc gag ggc tcc	1783
Ala His Gln Phe Glu Gly Asp Ser Phe Asp Ser Ala Ser Glu Gly Ser	
570 575 580	
gag ggc ctc ggg cca tgt gtg ctc tcc ctc agt acc ctg ata ggc act	1831
Glu Gly Leu Gly Pro Cys Val Leu Ser Leu Ser Thr Leu Ile Gly Thr	
585 590 595	
gtg gct gag aca tcc aag gag aag tac cgc ctg ctt gac cag aga gac	1879
Val Ala Glu Thr Ser Lys Glu Lys Tyr Arg Leu Leu Asp Gln Arg Asp	
600 605 610	
agg atc atg cgg caa gct cgg gtg aag aga acc gat ctg gac aaa gcg	1927
Arg Ile Met Arg Gln Ala Arg Val Lys Arg Thr Asp Leu Asp Lys Ala	
615 620 625 630	
agg act ttt gtt ggc acc tgc ctg gat atg tgt cct gag aag gag agg	1975
Arg Thr Phe Val Gly Thr Cys Leu Asp Met Cys Pro Glu Lys Glu Arg	
635 640 645	
tac atg cgg gag acc cgt agc cag ctg agc gtg ttc gaa gtg gtc cca	2023
Tyr Met Arg Glu Thr Arg Ser Gln Leu Ser Val Phe Glu Val Val Pro	
650 655 660	
ggg act gac cag gtg gac cac gca gca gct gtg aaa gag tac agt cgg	2071

Gly	Thr	Asp	Gln	Val	Asp	His	Ala	Ala	Ala	Val	Lys	Glu	Tyr	Ser	Arg	
		665					670					675				
tcc	tcg	gcg	gat	cag	gag	gag	ccc	ctg	ccc	cac	gag	ctg	cgg	ccc	ttg	2119
Ser	Ser	Ala	Asp	Gln	Glu	Glu	Pro	Leu	Pro	His	Glu	Leu	Arg	Pro	Leu	
	680					685					690					
cca	gtg	ctc	agc	agg	acc	atg	gac	tac	ctg	gtg	acc	cag	atc	atg	gac	2167
Pro	Val	Leu	Ser	Arg	Thr	Met	Asp	Tyr	Leu	Val	Thr	Gln	Ile	Met	Asp	
695				700					705						710	
cag	aag	gag	ggc	agc	ctg	cgg	gat	tgg	tat	gac	ttc	gtg	tgg	aac	cgc	2215
Gln	Lys	Glu	Gly	Ser	Leu	Arg	Asp	Trp	Tyr	Asp	Phe	Val	Trp	Asn	Arg	
			715					720						725		
acg	cgt	ggc	ata	cgg	aag	gat	atc	acg	cag	cag	cac	ctc	tgt	gac	ccc	2263
Thr	Arg	Gly	Ile	Arg	Lys	Asp	Ile	Thr	Gln	Gln	His	Leu	Cys	Asp	Pro	
		730						735					740			
ctg	acg	gtg	tcc	ctg	att	gag	aag	tgc	acc	cgg	ttt	cac	atc	cac	tgt	2311
Leu	Thr	Val	Ser	Leu	Ile	Glu	Lys	Cys	Thr	Arg	Phe	His	Ile	His	Cys	
	745					750					755					
gcc	cac	ttc	atg	tgt	gag	gag	ccc	atg	tcc	tcc	ttt	gat	gcc	aag	atc	2359
Ala	His	Phe	Met	Cys	Glu	Glu	Pro	Met	Ser	Ser	Phe	Asp	Ala	Lys	Ile	
	760					765					770					
aat	aat	gag	aac	atg	acc	aag	tgc	ctg	cag	agc	ctg	aag	gag	atg	tac	2407
Asn	Asn	Glu	Asn	Met	Thr	Lys	Cys	Leu	Gln	Ser	Leu	Lys	Glu	Met	Tyr	
775				780						785					790	
cag	gac	ctg	aga	aac	aag	ggt	gtc	ttc	tgt	gcc	agc	gaa	gcg	gag	ttc	2455
Gln	Asp	Leu	Arg	Asn	Lys	Gly	Val	Phe	Cys	Ala	Ser	Glu	Ala	Glu	Phe	
			795					800						805		
cag	ggc	tac	aat	gtt	ctg	ctc	agt	ctc	aac	aag	gga	gac	atc	cta	aga	2503
Gln	Gly	Tyr	Asn	Val	Leu	Leu	Ser	Leu	Asn	Lys	Gly	Asp	Ile	Leu	Arg	
		810						815					820			

gaa gta caa cag ttc cat cct gct gtt aga aac tca tct gag gtg aaa	2551
Glu Val Gln Gln Phe His Pro Ala Val Arg Asn Ser Ser Glu Val Lys	
825 830 835	
ttt gct gtt cag gct ttt gct gca ttg aac agt aat aat ttt gtg aga	2599
Phe Ala Val Gln Ala Phe Ala Ala Leu Asn Ser Asn Asn Phe Val Arg	
840 845 850	
ttt ttc aaa ctg gtc cag tca gct tct tac ctg aac gct tgt ctt tta	2647
Phe Phe Lys Leu Val Gln Ser Ala Ser Tyr Leu Asn Ala Cys Leu Leu	
855 860 865 870	
cac tgt tac ttc agt cag atc cgc aag gat gct ctc cgg gcg ctc aac	2695
His Cys Tyr Phe Ser Gln Ile Arg Lys Asp Ala Leu Arg Ala Leu Asn	
875 880 885	
ttt gcg tac acg gtg agc aca cag cga tct acc atc ttt ccc ctg gat	2743
Phe Ala Tyr Thr Val Ser Thr Gln Arg Ser Thr Ile Phe Pro Leu Asp	
890 895 900	
ggt gtg gtg cgc atg ctg ctg ttc aga gac tgt gaa gag gcc acc gac	2791
Gly Val Val Arg Met Leu Leu Phe Arg Asp Cys Glu Glu Ala Thr Asp	
905 910 915	
ttc ctc acc tgc cac ggc ctc acc gtt tcc gac ggc tgt gtg gag ctg	2839
Phe Leu Thr Cys His Gly Leu Thr Val Ser Asp Gly Cys Val Glu Leu	
920 925 930	
aac cgg tct gca ttc ctg gaa cca gag gga tta tcc aag acc agg aag	2887
Asn Arg Ser Ala Phe Leu Glu Pro Glu Gly Leu Ser Lys Thr Arg Lys	
935 940 945 950	
tcg gtg ttt att act agg aag ctg acg gtg tca gtc ggg gaa att gtg	2935
Ser Val Phe Ile Thr Arg Lys Leu Thr Val Ser Val Gly Glu Ile Val	
955 960 965	
aac gga ggg cca ttg ccc ccc gtc cct cgt cac acc cct gtg tgc agc	2983

Asn Gly Gly Pro Leu Pro Pro Val Pro Arg His Thr Pro Val Cys Ser	
970 975 980	
ttc aac tcc cag aac aag tac atc ggg gag agc ctg gcc gcg gag ctg	3031
Phe Asn Ser Gln Asn Lys Tyr Ile Gly Glu Ser Leu Ala Ala Glu Leu	
985 990 995	
ccc gtc agc acc cag aga ccc ggc tcc gac aca gtg ggc gga ggg	3076
Pro Val Ser Thr Gln Arg Pro Gly Ser Asp Thr Val Gly Gly Gly	
1000 1005 1010	
aga gga gag gag tgt ggt gta gag ccg gat gca ccc ctg tcc agt	3121
Arg Gly Glu Glu Cys Gly Val Glu Pro Asp Ala Pro Leu Ser Ser	
1015 1020 1025	
ctc cca cag tct cta cca gcc cct gcg ccc tca cca gtg cct ctg	3166
Leu Pro Gln Ser Leu Pro Ala Pro Ala Pro Ser Pro Val Pro Leu	
1030 1035 1040	
cct cct gtc ctg gca ctg acc ccg tct gtg gcg ccc agc ctc ttc	3211
Pro Pro Val Leu Ala Leu Thr Pro Ser Val Ala Pro Ser Leu Phe	
1045 1050 1055	
cag ctg tct gtg cag cct gaa cca ccg cct cca gag ccc gtg ccc	3256
Gln Leu Ser Val Gln Pro Glu Pro Pro Pro Pro Glu Pro Val Pro	
1060 1065 1070	
atg tac tct gac gag gac ctg gcg cag gtg gtg gac gag ctc atc	3301
Met Tyr Ser Asp Glu Asp Leu Ala Gln Val Val Asp Glu Leu Ile	
1075 1080 1085	
cag gag gcc ctg cag agg gac tgt gag gaa gtt ggc tct gcg ggt	3346
Gln Glu Ala Leu Gln Arg Asp Cys Glu Glu Val Gly Ser Ala Gly	
1090 1095 1100	
gct gcc tac gca gct gcc gcc ctg ggt gtt tct aat gct gct atg	3391
Ala Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Leu Gly Val Ser Asn Ala Ala Met	
1105 1110 1115	



gag gat	ttg tta	aca gct	gca acc	acg ggc	att ttg	agg cac	att	3436
Glu Asp	Leu Leu	Thr Ala	Ala Thr	Thr Thr	Gly Ile	Leu Arg	His Ile	
1120		1125		1130				
gca gct	gaa gaa	gtg tct	aag gaa	aga gag	cga agg	gag cag	gag	3481
Ala Ala	Glu Glu	Val Ser	Lys Glu	Arg Arg	Arg Arg	Glu Gln	Glu	
1135		1140		1145				
agg cag	cgg gct	gaa gag	gaa agg	ttg aaa	caa gag	aga gag	ctg	3526
Arg Gln	Arg Ala	Glu Glu	Glu Arg	Leu Lys	Gln Glu	Arg Glu	Leu	
1150		1155		1160				
gtg tta	agt gag	ctg agc	cag ggc	ctg gcc	gtg gag	ctg atg	gaa	3571
Val Leu	Ser Glu	Leu Ser	Gln Gly	Leu Ala	Val Glu	Leu Met	Glu	
1165		1170		1175				
cgc gtg	atg atg	gag ttt	gtg agg	gaa acc	tgc tcc	cag gag	ttg	3616
Arg Val	Met Met	Glu Phe	Val Arg	Glu Thr	Cys Ser	Gln Glu	Leu	
1180		1185		1190				
aag aat	gca gta	gag aca	gac cag	agg gtc	cgt gtg	gcc cgt	tgc	3661
Lys Asn	Ala Val	Glu Thr	Asp Gln	Arg Val	Arg Val	Ala Arg	Cys	
1195		1200		1205				
tgt gag	gat gtc	tgt gcc	cac tta	gtg gac	ttg ttt	ctc gtg	gag	3706
Cys Glu	Asp Val	Cys Ala	His Leu	Val Asp	Leu Phe	Leu Val	Glu	
1210		1215		1220				
gaa atc	ttc cag	act gca	aag gag	acc ctc	cag gag	ctt cag	tgc	3751
Glu Ile	Phe Gln	Thr Ala	Lys Glu	Thr Leu	Gln Glu	Leu Gln	Cys	
1225		1230		1235				
ttc tgc	aag tat	cta cag	cgg tgg	agg gaa	gct gtc	aca gcc	cgc	3796
Phe Cys	Lys Tyr	Leu Gln	Arg Trp	Arg Glu	Ala Val	Thr Ala	Arg	
1240		1245		1250				
aag aaa	ctg agg	cgc caa	atg cgg	gct ttc	cct gct	gcg ccc	tgc	3841

Lys	Lys	Leu	Arg	Arg	Gln	Met	Arg	Ala	Phe	Pro	Ala	Ala	Pro	Cys	
1255						1260					1265				
tgc	gtg	gac	gtg	agc	gac	cgg	ctg	agg	gcg	ctg	gcg	ccc	agc	gca	3886
Cys	Val	Asp	Val	Ser	Asp	Arg	Leu	Arg	Ala	Leu	Ala	Pro	Ser	Ala	
1270						1275					1280				
gag	tgc	ccc	att	gct	gaa	gag	aac	ctg	gcc	agg	ggc	ctc	ctg	gac	3931
Glu	Cys	Pro	Ile	Ala	Glu	Glu	Asn	Leu	Ala	Arg	Gly	Leu	Leu	Asp	
1285						1290					1295				
ctg	ggc	cat	gca	ggg	aga	ttg	ggc	atc	tct	tgc	acc	agg	tta	agg	3976
Leu	Gly	His	Ala	Gly	Arg	Leu	Gly	Ile	Ser	Cys	Thr	Arg	Leu	Arg	
1300						1305					1310				
cgg	ctc	aga	aac	aag	aca	gct	cac	cag	atg	aag	gtt	cag	cac	ttc	4021
Arg	Leu	Arg	Asn	Lys	Thr	Ala	His	Gln	Met	Lys	Val	Gln	His	Phe	
1315						1320					1325				
tac	cag	cag	ctg	ctg	agt	gat	gtg	gca	tgg	gcg	tct	ctg	gac	ctg	4066
Tyr	Gln	Gln	Leu	Leu	Ser	Asp	Val	Ala	Trp	Ala	Ser	Leu	Asp	Leu	
1330						1335					1340				
cca	tcc	ctc	gtg	gct	gag	cac	ctc	cct	ggg	agg	cag	gag	cat	gtg	4111
Pro	Ser	Leu	Val	Ala	Glu	His	Leu	Pro	Gly	Arg	Gln	Glu	His	Val	
1345						1350					1355				
ttt	tgg	aag	ctg	gtg	ctg	gtg	ttg	ccg	gat	gta	gag	gag	cag	tcc	4156
Phe	Trp	Lys	Leu	Val	Leu	Val	Leu	Pro	Asp	Val	Glu	Glu	Gln	Ser	
1360						1365					1370				
cca	gag	agt	tgt	ggc	aga	att	cta	gca	aat	tgg	tta	aaa	gtc	aag	4201
Pro	Glu	Ser	Cys	Gly	Arg	Ile	Leu	Ala	Asn	Trp	Leu	Lys	Val	Lys	
1375						1380					1385				
ttc	atg	gga	gat	gaa	ggc	tca	gtg	gat	gac	aca	tcc	agc	gat	gct	4246
Phe	Met	Gly	Asp	Glu	Gly	Ser	Val	Asp	Asp	Thr	Ser	Ser	Asp	Ala	
1390						1395					1400				

ggt ggg att cag acg ctt tcg ctt ttc aac tca ctt agc agc aaa	4291
Gly Gly Ile Gln Thr Leu Ser Leu Phe Asn Ser Leu Ser Ser Lys	
1405 1410 1415	
ggg gat cag atg att tct gtt aac gtg tgt ata aag gtg gcc cat	4336
Gly Asp Gln Met Ile Ser Val Asn Val Cys Ile Lys Val Ala His	
1420 1425 1430	
ggc gcc ctc agt gat ggt gcc att gat gct gtg gag aca cag aag	4381
Gly Ala Leu Ser Asp Gly Ala Ile Asp Ala Val Glu Thr Gln Lys	
1435 1440 1445	
gac ctc ctg gga gcc agt ggg ctc atg ctg ctg ctt ccc ccc aaa	4426
Asp Leu Leu Gly Ala Ser Gly Leu Met Leu Leu Leu Pro Pro Lys	
1450 1455 1460	
atg aag agt gag gac atg gca gag gag gac gtg tac tgg ctg tcg	4471
Met Lys Ser Glu Asp Met Ala Glu Glu Asp Val Tyr Trp Leu Ser	
1465 1470 1475	
gcc ttg ctg cag ctc aag cag ctc ctg cag gct aag ccc ttc cag	4516
Ala Leu Leu Gln Leu Lys Gln Leu Leu Gln Ala Lys Pro Phe Gln	
1480 1485 1490	
cct gcg ctt cct ctg gtg gtt ctt gtg cct agc cca gga ggg gac	4561
Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Val Pro Ser Pro Gly Gly Asp	
1495 1500 1505	
gcc gtt gag aag gaa gta gaa gat ggt ctg atg cta cag gac ttg	4606
Ala Val Glu Lys Glu Val Glu Asp Gly Leu Met Leu Gln Asp Leu	
1510 1515 1520	
gtt tca gct aag ctg att tca gat tac act gtt acc gag atc cct	4651
Val Ser Ala Lys Leu Ile Ser Asp Tyr Thr Val Thr Glu Ile Pro	
1525 1530 1535	
gat acc att aat gat cta caa ggt tca act aag gtt ttg caa gca	4696

Asp Thr Ile Asn Asp Leu Gln Gly Ser Thr Lys Val Leu Gln Ala	
1540 1545 1550	
gtg cag tgg ctg gtt tcc cac tgc ccc cat tcc ctt gac ctc tgc	4741
Val Gln Trp Leu Val Ser His Cys Pro His Ser Leu Asp Leu Cys	
1555 1560 1565	
tgc cag act ctc att cag tac gtc gaa gac ggg att ggc cat gag	4786
Cys Gln Thr Leu Ile Gln Tyr Val Glu Asp Gly Ile Gly His Glu	
1570 1575 1580	
ttt agt ggc cgc ttt ttc cat gac aga aga gag agg cgt ctg ggc	4831
Phe Ser Gly Arg Phe Phe His Asp Arg Arg Glu Arg Arg Leu Gly	
1585 1590 1595	
ggt ctt gct tct cag gag cct ggc gcc atc att gag ctg ttt aac	4876
Gly Leu Ala Ser Gln Glu Pro Gly Ala Ile Ile Glu Leu Phe Asn	
1600 1605 1610	
agt gtg ctg cag ttc ctg gct tct gtg gtg tcc tct gaa cag ctg	4921
Ser Val Leu Gln Phe Leu Ala Ser Val Val Ser Ser Glu Gln Leu	
1615 1620 1625	
tgt gac ctg tcc tgg cct gtc act gag ttt gct gag gca ggg ggc	4966
Cys Asp Leu Ser Trp Pro Val Thr Glu Phe Ala Glu Ala Gly Gly	
1630 1635 1640	
agc cgg ctg ctt cct cac ctg cac tgg aat gcc cca gag cac ctg	5011
Ser Arg Leu Leu Pro His Leu His Trp Asn Ala Pro Glu His Leu	
1645 1650 1655	
gcc tgg ctg aag cag gct gtg ctc ggg ttc cag ctt ccg cag atg	5056
Ala Trp Leu Lys Gln Ala Val Leu Gly Phe Gln Leu Pro Gln Met	
1660 1665 1670	
gac ctt cca ccc ctg ggg gcc ccc tgg ctc ccc gtg tgc tcc atg	5101
Asp Leu Pro Pro Leu Gly Ala Pro Trp Leu Pro Val Cys Ser Met	
1675 1680 1685	

gtt gtc cag tac gcc tcc cag atc ccc agc tca cgc cag aca cag	5146
Val Val Gln Tyr Ala Ser Gln Ile Pro Ser Ser Arg Gln Thr Gln	
1690 1695 1700	
cct gtc ctc cag tcc cag gtg gag aac ctg ctc cac aga acc tac	5191
Pro Val Leu Gln Ser Gln Val Glu Asn Leu Leu His Arg Thr Tyr	
1705 1710 1715	
tgt agg tgg aag agc aag agt ccc tcc cca gtc cat ggg gca ggc	5236
Cys Arg Trp Lys Ser Lys Ser Pro Ser Pro Val His Gly Ala Gly	
1720 1725 1730	
ccc tcg gtc atg gag atc cca tgg gat gat ctt atc gcc ttg tgt	5281
Pro Ser Val Met Glu Ile Pro Trp Asp Asp Leu Ile Ala Leu Cys	
1735 1740 1745	
atc aac cac aag ctg aga gac tgg acg ccc ccc cgg ctt cct gtt	5326
Ile Asn His Lys Leu Arg Asp Trp Thr Pro Pro Arg Leu Pro Val	
1750 1755 1760	
aca tca gag gcg ctg agt gaa gat ggt cag ata tgt gtg tat ttt	5371
Thr Ser Glu Ala Leu Ser Glu Asp Gly Gln Ile Cys Val Tyr Phe	
1765 1770 1775	
ttt aaa aac gat ttg aaa aaa tat gat gtt cct ttg tcg tgg gaa	5416
Phe Lys Asn Asp Leu Lys Lys Tyr Asp Val Pro Leu Ser Trp Glu	
1780 1785 1790	
caa gcc agg ttg cag acg cag aag gag cta cag ctg aga gag gga	5461
Gln Ala Arg Leu Gln Thr Gln Lys Glu Leu Gln Leu Arg Glu Gly	
1795 1800 1805	
cgt ttg gca ata aag cct ttt cat cct tct gca aac aat ttt ccc	5506
Arg Leu Ala Ile Lys Pro Phe His Pro Ser Ala Asn Asn Phe Pro	
1810 1815 1820	
ata cca ttg ctt cac atg cac cgt aac tgg aag agg agc aca gag	5551

Ile	Pro	Leu	Leu	His	Met	His	Arg	Asn	Trp	Lys	Arg	Ser	Thr	Glu	
1825						1830					1835				
tgt	gct	caa	gag	ggg	agg	att	ccc	agc	aca	gag	gat	ctg	atg	cga	5596
Cys	Ala	Gln	Glu	Gly	Arg	Ile	Pro	Ser	Thr	Glu	Asp	Leu	Met	Arg	
1840						1845					1850				
gga	gct	tct	gct	gag	gag	ctc	ttg	gcg	cag	tgt	ttg	tcg	agc	agt	5641
Gly	Ala	Ser	Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Gln	Cys	Leu	Ser	Ser	Ser	
1855						1860					1865				
ctg	ctg	ctg	gag	aaa	gaa	gag	aac	aag	agg	ttt	gaa	gat	cag	ctt	5686
Leu	Leu	Leu	Glu	Lys	Glu	Glu	Asn	Lys	Arg	Phe	Glu	Asp	Gln	Leu	
1870						1875					1880				
cag	caa	tgg	ttg	tct	gaa	gac	tca	gga	gca	ttt	acg	gat	tta	act	5731
Gln	Gln	Trp	Leu	Ser	Glu	Asp	Ser	Gly	Ala	Phe	Thr	Asp	Leu	Thr	
1885						1890					1895				
tcc	ctt	ccc	ctc	tat	ctt	cct	cag	act	cta	gtg	tct	ctt	tct	cac	5776
Ser	Leu	Pro	Leu	Tyr	Leu	Pro	Gln	Thr	Leu	Val	Ser	Leu	Ser	His	
1900						1905					1910				
act	att	gaa	cct	gtg	atg	aaa	aca	tct	gta	act	act	agc	cca	cag	5821
Thr	Ile	Glu	Pro	Val	Met	Lys	Thr	Ser	Val	Thr	Thr	Ser	Pro	Gln	
1915						1920					1925				
agt	gac	atg	atg	agg	gag	caa	ctg	cag	ctg	tca	gag	gcg	aca	gga	5866
Ser	Asp	Met	Met	Arg	Glu	Gln	Leu	Gln	Leu	Ser	Glu	Ala	Thr	Gly	
1930						1935					1940				
acg	tgt	cta	ggc	gaa	cga	cta	aag	cac	ctg	gaa	agg	ctg	atc	cgg	5911
Thr	Cys	Leu	Gly	Glu	Arg	Leu	Lys	His	Leu	Glu	Arg	Leu	Ile	Arg	
1945						1950					1955				
agt	tca	agg	gaa	gag	gaa	gtt	gcc	tct	gag	ctc	cat	ctc	tct	gcg	5956
Ser	Ser	Arg	Glu	Glu	Glu	Val	Ala	Ser	Glu	Leu	His	Leu	Ser	Ala	
1960						1965					1970				



ctg cta gac atg gtg gac att tgagcagcct gacctgtggg gaggggtct 6007  
Leu Leu Asp Met Val Asp Ile  
1975 1980

ctcccgaaga gtttctgttt ttactcaaaa taatgttatt ctcatatgct tgaatgcactg 6067  
ttggaaatgt gattaattta atcatgcaga taaaccattt aaatgtc 6114

<210> 4  
<211> 1980  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Asn Pro Thr Asn Pro Phe Ser Gly Gln Gln Pro Ser Ala Phe Ser  
1 5 10 15

Ala Ser Ser Ser Asn Val Gly Thr Leu Pro Ser Lys Pro Pro Phe Arg  
20 25 30

Phe Gly Gln Pro Ser Leu Phe Gly Gln Asn Ser Thr Leu Ser Gly Lys  
35 40 45

Ser Ser Gly Phe Ser Gln Val Ser Ser Phe Pro Ala Ser Ser Gly Val  
50 55 60

Ser His Ser Ser Ser Val Gln Thr Leu Gly Phe Thr Gln Thr Ser Ser  
65 70 75 80

Val Gly Pro Phe Ser Gly Leu Glu His Thr Ser Thr Phe Val Ala Thr

85

90

95

Ser Gly Pro Ser Ser Ser Ser Val Leu Gly Asn Thr Gly Phe Ser Phe  
100 105 110

Lys Ser Pro Thr Ser Val Gly Ala Phe Pro Ser Thr Ser Ala Phe Gly  
115 120 125

Gln Glu Ala Gly Glu Ile Val Asn Ser Gly Phe Gly Lys Thr Glu Phe  
130 135 140

Ser Phe Lys Pro Leu Glu Asn Ala Val Phe Lys Pro Ile Leu Gly Ala  
145 150 155 160

Glu Ser Glu Pro Glu Lys Thr Gln Ser Gln Ile Ala Ser Gly Phe Phe  
165 170 175

Thr Phe Ser His Pro Ile Ser Ser Ala Pro Gly Gly Leu Ala Pro Phe  
180 185 190

Ser Phe Pro Gln Val Thr Ser Ser Ser Ala Thr Thr Ser Asn Phe Thr  
195 200 205

Phe Ser Lys Pro Val Ser Ser Asn Asn Ser Leu Ser Ala Phe Thr Pro  
210 215 220

Ala Leu Ser Asn Gln Asn Val Glu Glu Glu Lys Arg Gly Pro Lys Ser  
225 230 235 240

Ile Phe Gly Ser Ser Asn Asn Ser Phe Ser Ser Phe Pro Val Ser Ser  
245 250 255

Ala Val Leu Gly Glu Pro Phe Gln Ala Ser Lys Ala Gly Val Arg Gln  
260 265 270

Gly Cys Glu Glu Ala Val Ser Gln Val Glu Pro Leu Pro Ser Leu Met  
275 280 285

Lys Gly Leu Lys Arg Lys Glu Asp Gln Asp Arg Ser Pro Arg Arg His  
290 295 300

Gly His Glu Pro Ala Glu Asp Ser Asp Pro Leu Ser Arg Gly Asp His  
305 310 315 320

Pro Pro Asp Lys Arg Pro Val Arg Leu Asn Arg Pro Arg Gly Gly Thr  
325 330 335

Leu Phe Gly Arg Thr Ile Gln Asp Val Phe Lys Ser Asn Lys Glu Val  
340 345 350

Gly Arg Leu Gly Asn Lys Glu Ala Lys Lys Glu Thr Gly Phe Val Glu  
355 360 365

Ser Ala Glu Ser Asp His Met Ala Ile Pro Gly Gly Asn Gln Ser Val  
370 375 380

Leu Ala Pro Ser Arg Ile Pro Gly Val Asn Lys Glu Glu Glu Thr Glu

46/64

Gly Arg Thr Gly Ala Ser Ser Leu Leu Asn Lys Ser Ser Pro Val Lys  
545 550 555 560

Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala His Gln Phe Glu Gly Asp Ser Phe Asp  
565 570 575

Ser Ala Ser Glu Gly Ser Glu Gly Leu Gly Pro Cys Val Leu Ser Leu  
580 585 590

Ser Thr Leu Ile Gly Thr Val Ala Glu Thr Ser Lys Glu Lys Tyr Arg  
595 600 605

Leu Leu Asp Gln Arg Asp Arg Ile Met Arg Gln Ala Arg Val Lys Arg  
610 615 620

Thr Asp Leu Asp Lys Ala Arg Thr Phe Val Gly Thr Cys Leu Asp Met  
625 630 635 640

Cys Pro Glu Lys Glu Arg Tyr Met Arg Glu Thr Arg Ser Gln Leu Ser  
645 650 655

Val Phe Glu Val Val Pro Gly Thr Asp Gln Val Asp His Ala Ala Ala  
660 665 670

Val Lys Glu Tyr Ser Arg Ser Ser Ala Asp Gln Glu Glu Pro Leu Pro  
675 680 685

His Glu Leu Arg Pro Leu Pro Val Leu Ser Arg Thr Met Asp Tyr Leu

690

695

700

Val Thr Gln Ile Met Asp Gln Lys Glu Gly Ser Leu Arg Asp Trp Tyr  
705 710 715 720

Asp Phe Val Trp Asn Arg Thr Arg Gly Ile Arg Lys Asp Ile Thr Gln  
725 730 735

Gln His Leu Cys Asp Pro Leu Thr Val Ser Leu Ile Glu Lys Cys Thr  
740 745 750

Arg Phe His Ile His Cys Ala His Phe Met Cys Glu Glu Pro Met Ser  
755 760 765

Ser Phe Asp Ala Lys Ile Asn Asn Glu Asn Met Thr Lys Cys Leu Gln  
770 775 780

Ser Leu Lys Glu Met Tyr Gln Asp Leu Arg Asn Lys Gly Val Phe Cys  
785 790 795 800

Ala Ser Glu Ala Glu Phe Gln Gly Tyr Asn Val Leu Leu Ser Leu Asn  
805 810 815

Lys Gly Asp Ile Leu Arg Glu Val Gln Gln Phe His Pro Ala Val Arg  
820 825 830

Asn Ser Ser Glu Val Lys Phe Ala Val Gln Ala Phe Ala Ala Leu Asn  
835 840 845



Ser Asn Asn Phe Val Arg Phe Phe Lys Leu Val Gln Ser Ala Ser Tyr  
850 855 860

Leu Asn Ala Cys Leu Leu His Cys Tyr Phe Ser Gln Ile Arg Lys Asp  
865 870 875 880

Ala Leu Arg Ala Leu Asn Phe Ala Tyr Thr Val Ser Thr Gln Arg Ser  
885 890 895

Thr Ile Phe Pro Leu Asp Gly Val Val Arg Met Leu Leu Phe Arg Asp  
900 905 910

Cys Glu Glu Ala Thr Asp Phe Leu Thr Cys His Gly Leu Thr Val Ser  
915 920 925

Asp Gly Cys Val Glu Leu Asn Arg Ser Ala Phe Leu Glu Pro Glu Gly  
930 935 940

Leu Ser Lys Thr Arg Lys Ser Val Phe Ile Thr Arg Lys Leu Thr Val  
945 950 955 960

Ser Val Gly Glu Ile Val Asn Gly Gly Pro Leu Pro Pro Val Pro Arg  
965 970 975

His Thr Pro Val Cys Ser Phe Asn Ser Gln Asn Lys Tyr Ile Gly Glu  
980 985 990

Ser Leu Ala Ala Glu Leu Pro Val Ser Thr Gln Arg Pro Gly Ser Asp

995

1000

1005

Thr Val Gly Gly Gly Arg Gly Glu Glu Cys Gly Val Glu Pro Asp  
1010 1015 1020

Ala Pro Leu Ser Ser Leu Pro Gln Ser Leu Pro Ala Pro Ala Pro  
1025 1030 1035

Ser Pro Val Pro Leu Pro Pro Val Leu Ala Leu Thr Pro Ser Val  
1040 1045 1050

Ala Pro Ser Leu Phe Gln Leu Ser Val Gln Pro Glu Pro Pro Pro  
1055 1060 1065

Pro Glu Pro Val Pro Met Tyr Ser Asp Glu Asp Leu Ala Gln Val  
1070 1075 1080

Val Asp Glu Leu Ile Gln Glu Ala Leu Gln Arg Asp Cys Glu Glu  
1085 1090 1095

Val Gly Ser Ala Gly Ala Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Leu Gly Val  
1100 1105 1110

Ser Asn Ala Ala Met Glu Asp Leu Leu Thr Ala Ala Thr Thr Gly  
1115 1120 1125

Ile Leu Arg His Ile Ala Ala Glu Glu Val Ser Lys Glu Arg Glu  
1130 1135 1140

Arg Arg Glu Gln Glu Arg Gln Arg Ala Glu Glu Glu Arg Leu Lys  
1145 1150 1155

Gln Glu Arg Glu Leu Val Leu Ser Glu Leu Ser Gln Gly Leu Ala  
1160 1165 1170

Val Glu Leu Met Glu Arg Val Met Met Glu Phe Val Arg Glu Thr  
1175 1180 1185

Cys Ser Gln Glu Leu Lys Asn Ala Val Glu Thr Asp Gln Arg Val  
1190 1195 1200

Arg Val Ala Arg Cys Cys Glu Asp Val Cys Ala His Leu Val Asp  
1205 1210 1215

Leu Phe Leu Val Glu Glu Ile Phe Gln Thr Ala Lys Glu Thr Leu  
1220 1225 1230

Gln Glu Leu Gln Cys Phe Cys Lys Tyr Leu Gln Arg Trp Arg Glu  
1235 1240 1245

Ala Val Thr Ala Arg Lys Lys Leu Arg Arg Gln Met Arg Ala Phe  
1250 1255 1260

Pro Ala Ala Pro Cys Cys Val Asp Val Ser Asp Arg Leu Arg Ala  
1265 1270 1275

Leu Ala Pro Ser Ala Glu Cys Pro Ile Ala Glu Glu Asn Leu Ala

1280	1285	1290
Arg Gly Leu Leu Asp Leu Gly His Ala Gly Arg Leu Gly Ile Ser		
1295	1300	1305
Cys Thr Arg Leu Arg Arg Leu Arg Asn Lys Thr Ala His Gln Met		
1310	1315	1320
Lys Val Gln His Phe Tyr Gln Gln Leu Leu Ser Asp Val Ala Trp		
1325	1330	1335
Ala Ser Leu Asp Leu Pro Ser Leu Val Ala Glu His Leu Pro Gly		
1340	1345	1350
Arg Gln Glu His Val Phe Trp Lys Leu Val Leu Val Leu Pro Asp		
1355	1360	1365
Val Glu Glu Gln Ser Pro Glu Ser Cys Gly Arg Ile Leu Ala Asn		
1370	1375	1380
Trp Leu Lys Val Lys Phe Met Gly Asp Glu Gly Ser Val Asp Asp		
1385	1390	1395
Thr Ser Ser Asp Ala Gly Gly Ile Gln Thr Leu Ser Leu Phe Asn		
1400	1405	1410
Ser Leu Ser Ser Lys Gly Asp Gln Met Ile Ser Val Asn Val Cys		
1415	1420	1425

Ile Lys Val Ala His Gly Ala Leu Ser Asp Gly Ala Ile Asp Ala  
1430 1435 1440

Val Glu Thr Gln Lys Asp Leu Leu Gly Ala Ser Gly Leu Met Leu  
1445 1450 1455

Leu Leu Pro Pro Lys Met Lys Ser Glu Asp Met Ala Glu Glu Asp  
1460 1465 1470

Val Tyr Trp Leu Ser Ala Leu Leu Gln Leu Lys Gln Leu Leu Gln  
1475 1480 1485

Ala Lys Pro Phe Gln Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Val Pro  
1490 1495 1500

Ser Pro Gly Gly Asp Ala Val Glu Lys Glu Val Glu Asp Gly Leu  
1505 1510 1515

Met Leu Gln Asp Leu Val Ser Ala Lys Leu Ile Ser Asp Tyr Thr  
1520 1525 1530

Val Thr Glu Ile Pro Asp Thr Ile Asn Asp Leu Gln Gly Ser Thr  
1535 1540 1545

Lys Val Leu Gln Ala Val Gln Trp Leu Val Ser His Cys Pro His  
1550 1555 1560

Ser Leu Asp Leu Cys Cys Gln Thr Leu Ile Gln Tyr Val Glu Asp

1565		1570		1575
Gly Ile Gly His Glu Phe Ser Gly Arg Phe Phe His Asp Arg Arg				
1580		1585		1590
Glu Arg Arg Leu Gly Gly Leu Ala Ser Gln Glu Pro Gly Ala Ile				
1595		1600		1605
Ile Glu Leu Phe Asn Ser Val Leu Gln Phe Leu Ala Ser Val Val				
1610		1615		1620
Ser Ser Glu Gln Leu Cys Asp Leu Ser Trp Pro Val Thr Glu Phe				
1625		1630		1635
Ala Glu Ala Gly Gly Ser Arg Leu Leu Pro His Leu His Trp Asn				
1640		1645		1650
Ala Pro Glu His Leu Ala Trp Leu Lys Gln Ala Val Leu Gly Phe				
1655		1660		1665
Gln Leu Pro Gln Met Asp Leu Pro Pro Leu Gly Ala Pro Trp Leu				
1670		1675		1680
Pro Val Cys Ser Met Val Val Gln Tyr Ala Ser Gln Ile Pro Ser				
1685		1690		1695
Ser Arg Gln Thr Gln Pro Val Leu Gln Ser Gln Val Glu Asn Leu				
1700		1705		1710



Leu His Arg Thr Tyr Cys Arg Trp Lys Ser Lys Ser Pro Ser Pro  
 1715 1720 1725

Val His Gly Ala Gly Pro Ser Val Met Glu Ile Pro Trp Asp Asp  
 1730 1735 1740

Leu Ile Ala Leu Cys Ile Asn His Lys Leu Arg Asp Trp Thr Pro  
 1745 1750 1755

Pro Arg Leu Pro Val Thr Ser Glu Ala Leu Ser Glu Asp Gly Gln  
 1760 1765 1770

Ile Cys Val Tyr Phe Phe Lys Asn Asp Leu Lys Lys Tyr Asp Val  
 1775 1780 1785

Pro Leu Ser Trp Glu Gln Ala Arg Leu Gln Thr Gln Lys Glu Leu  
 1790 1795 1800

Gln Leu Arg Glu Gly Arg Leu Ala Ile Lys Pro Phe His Pro Ser  
 1805 1810 1815

Ala Asn Asn Phe Pro Ile Pro Leu Leu His Met His Arg Asn Trp  
 1820 1825 1830

Lys Arg Ser Thr Glu Cys Ala Gln Glu Gly Arg Ile Pro Ser Thr  
 1835 1840 1845

Glu Asp Leu Met Arg Gly Ala Ser Ala Glu Glu Leu Leu Ala Gln

1850

1855

1860

Cys Leu Ser Ser Ser Leu Leu Leu Glu Lys Glu Glu Asn Lys Arg  
1865 1870 1875

Phe Glu Asp Gln Leu Gln Gln Trp Leu Ser Glu Asp Ser Gly Ala  
1880 1885 1890

Phe Thr Asp Leu Thr Ser Leu Pro Leu Tyr Leu Pro Gln Thr Leu  
1895 1900 1905

Val Ser Leu Ser His Thr Ile Glu Pro Val Met Lys Thr Ser Val  
1910 1915 1920

Thr Thr Ser Pro Gln Ser Asp Met Met Arg Glu Gln Leu Gln Leu  
1925 1930 1935

Ser Glu Ala Thr Gly Thr Cys Leu Gly Glu Arg Leu Lys His Leu  
1940 1945 1950

Glu Arg Leu Ile Arg Ser Ser Arg Glu Glu Glu Val Ala Ser Glu  
1955 1960 1965

Leu His Leu Ser Ala Leu Leu Asp Met Val Asp Ile  
1970 1975 1980

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 863

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; retroviral provirus

&lt;400&gt; 5

Lys Glu Gln Lys Thr Val Ala Met Arg Val Lys Glu Lys Tyr Gln His  
1 5 10 15

Leu Trp Arg Trp Gly Trp Arg Trp Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Leu  
20 25 30

Met Ile Cys Ser Ala Thr Glu Lys Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly  
35 40 45

Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp  
50 55 60

Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala  
65 70 75 80

Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro Gln Glu Val Val Leu Val Asn Val  
85 90 95

Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys Asn Asp Met Val Glu Gln Met His  
100 105 110

Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys  
115 120 125

Leu Thr Pro Leu Cys Val Ser Leu Lys Cys Thr Asp Leu Lys Asn Asp  
130 135 140

Thr Asn Thr Asn Ser Ser Ser Gly Arg Met Ile Met Glu Lys Gly Glu  
145 150 155 160

Ile Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ile Ser Thr Ser Ile Arg Gly Lys Val  
165 170 175

Gln Lys Glu Tyr Ala Phe Phe Tyr Lys Leu Asp Ile Ile Pro Ile Asp  
180 185 190

Asn Asp Thr Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile  
195 200 205

Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr  
210 215 220

Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Lys Thr Phe  
225 230 235 240

Asn Gly Thr Gly Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His  
245 250 255

Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu  
260 265 270

Ala Glu Glu Glu Val Val Ile Arg Ser Ala Asn Phe Thr Asp Asn Ala  
275 280 285

Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu Asn Gln Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr  
290 295 300

Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gln Arg Gly Pro  
305 310 315 320

Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys Ile Gly Asn Met Arg Gln Ala  
325 330 335

His Cys Asn Ile Ser Arg Ala Lys Trp Asn Asn Thr Leu Lys Gln Ile  
340 345 350

Asp Ser Lys Leu Arg Glu Gln Phe Gly Asn Asn Lys Thr Ile Ile Phe  
355 360 365

Lys Gln Ser Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val Thr His Ser Phe Asn  
370 375 380

Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Ser Thr Gln Leu Phe Asn Ser  
385 390 395 400

Thr Trp Phe Asn Ser Thr Trp Ser Thr Lys Gly Ser Asn Asn Thr Glu  
405 410 415

Gly Ser Asp Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn  
420 425 430

Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly  
435 440 445

Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp  
450 455 460

Gly Gly Asn Ser Asn Asn Glu Ser Glu Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly  
465 470 475 480

Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val  
485 490 495

Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val  
500 505 510

Val Gln Arg Glu Lys Arg Ala Val Gly Ile Gly Ala Leu Phe Leu Gly  
515 520 525

Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Met Thr Leu  
530 535 540

Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn  
545 550 555 560

Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr  
565 570 575

Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg  
580 585 590

Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys  
595 600 605

Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys  
610 615 620

Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg  
625 630 635 640

Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser  
645 650 655

Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys  
660 665 670

Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr  
675 680 685

Ile Lys Leu Phe Ile Met Ile Val Gly Gly Leu Val Gly Leu Arg Ile  
690 695 700

Val Phe Ala Val Leu Ser Val Val Asn Arg Val Arg Gln Gly Tyr Ser  
705 710 715 720

Pro Leu Ser Phe Gln Thr His Leu Pro Ile Pro Arg Gly Pro Asp Arg  
725 730 735

Pro Glu Gly Ile Glu Glu Glu Gly Gly Glu Arg Asp Arg Asp Arg Ser  
740 745 750



Ile Arg Leu Val Asn Gly Ser Leu Ala Leu Ile Trp Asp Asp Leu Arg  
755 760 765

Ser Leu Cys Leu Phe Ser Tyr His Arg Leu Arg Asp Leu Leu Leu Ile  
770 775 780

Val Thr Arg Ile Val Glu Leu Leu Gly Arg Arg Gly Trp Glu Ala Leu  
785 790 795 800

Lys Tyr Trp Trp Asn Leu Leu Gln Tyr Trp Ser Gln Glu Leu Lys Asn  
805 810 815

Ser Ala Val Ser Leu Leu Asn Ala Thr Ala Ile Ala Val Ala Glu Gly  
820 825 830

Thr Asp Arg Val Ile Glu Val Val Gln Gly Ala Tyr Arg Ala Ile Arg  
835 840 845

His Ile Pro Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Glu Arg Ile Leu Leu  
850 855 860

<210> 6

<211> 23

<212> PRT

<213> retroviral provirus

<400> 6

Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala

1

5

10

15

Phe Val Thr Ile Gly Lys Ile

20

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial s equence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt; 7

tcccgccttc cagctgtgac

20

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial s equence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt; 8

gtgctgctgt gttatgtcct

20

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; retroviral p rovirus

&lt;400&gt; 9

Cys Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys Ile  
20  
61/64

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003046

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/10, C12N15/09, C12P21/08, A61K39/42, G01N33/563

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/10, C12N15/09, C12P21/08, A61K39/42, G01N33/563

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), JSTPLUS FILE (JOIS), SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LAMAN J.D. et al., Variant-specific monoclonal and group-specific polyclonal human immunodeficiency virus type 1 neutralizing antibodies raised with synthetic peptides from the gp120 third variable domain., J.Virol. 1992, Vol.66, No.3, pages 1823 to 1831	1-6
X	BOUDET F. et al., Anti-Idiotypic Antibodies to the Third Variable Domain of gp120 Induce an Anti-HIV-1 Antibody Response in Mice., Virology, 1994, Vol.200, No.1, pages 176 to 188	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 April, 2004 (09.04.04)

Date of mailing of the international search report

27 April, 2004 (27.04.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003046

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ABE E. et al., Structure, expression, and chromosomal localization of the human gene encoding a germinal center-associated nuclear protein (GANP) that associates with MCM3 involved in the initiation of DNA replication., Gene, 2000, Vol.255, No.2, pages 219 to 227	7-14
A	Kazuhiko KUWABARA, "Kogen Tokuiteki B Saibo no Kasseika to GANP Bunshi no Men'eki Oto ni Okeru Kino", Molecular Medicine, special extra issu, Men'eki 2004, 10 December, 2003 (10.12.03), Vol.40, pages 40 to 48	7-14

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K16/10, C12N15/09, C12P21/08, A61K39/42, G01N33/563

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K16/10, C12N15/09, C12P21/08, A61K39/42, G01N33/563

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), EGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), JSTPLUSファイル (JOIS)

SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	LAMAN J.D. et al., Variant-specific monoclonal and group-specific polyclonal human immunodeficiency virus type 1 neutralizing antibodies raised with synthetic peptides from the gp120 third variable domain., J Virol. 1992, Vol.66, No.3, p.1823-1831	1-6
X	BOUDET F. et al., Anti-Idiotypic Antibodies to the Third Variable Domain of gp120 Induce an Anti-HIV-1 Antibody Response in Mice., Virology, 1994, Vol.200, No.1, p.176-188	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.04.2004

国際調査報告の発送日

27.4.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

佐久 敬

4 B

3037

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	ABE E. et al., Structure, expression, and chromosomal localization of the human gene encoding a germinal center-associated nuclear protein (GANP) that associates with MCM3 involved in the initiation of DNA replication., Gene, 2000, Vol.255, No.2, p.219-227	7-14
A	桑原一彦他、抗原特異的B細胞の活性化とGANP分子の免疫応答における機能、Molecular Medicine 臨時増刊号 免疫2004, 2003.12.10, Vol.40, p.40-48	7-14